

Promotoranalyse des gehirnspezifisch exprimierten Gens 83.5

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Sabine Perl
aus Langen

Berichterstatter:

Prof. Dr. H. G. Gassen

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. P. Friedl

Tag der Einreichung:

25. März 2002

Tag der mündlichen Prüfung:

13. Mai 2002

Darmstadt 2002

Mein herzlicher Dank gilt allen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Vor allem Herrn Prof. Dr. H. G. Gassen, unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, für sein fachliches Interesse am Fortgang der Arbeit, seiner anhaltenden Diskussionsbereitschaft sowie seiner konstruktiven Kritik, die für den Verlauf dieser Arbeit maßgeblich waren. Für die gewährten Möglichkeiten, die über die eigenen Forschungsarbeiten hinausgingen, bin ich sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. P. Friedl bin ich für die Übernahme des Koreferats und besonders für die Möglichkeit, die Zellkultivierung in seinem Arbeitskreis durchzuführen, sehr dankbar.

Herrn Dr. M. Gassen der Firma Merck KGaA danke ich für die Bereitstellung der neuronalen Zelllinien.

Dem Land Hessen danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Prof. Dr. P. Friedl danke ich für die gute, angenehme Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft. Insbesondere gilt mein Dank Herrn Dr. Rüdiger Graf für die theoretische und praktische Einführung in die Geheimnisse der Zellkultur.

Für eine äußerst gute und engagierte Zusammenarbeit während seiner Diplomarbeit möchte ich mich bei Herrn Dipl.-Ing Bernd Uwe Failer herzlich bedanken. Frau Dipl. Ing. Meurer danke ich für das Engagement während ihrer Hauptvertiefung.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe sowie des gesamten Instituts, die mich auf meinem Weg begleitet haben. Besonders danken möchte ich Frau Dr. Angela Oberthür für die gute Zusammenarbeit, ihre stete Hilfsbereitschaft und die zahlreichen fachlichen und nichtfachlichen Gespräche.

Herrn Dr. Bangsow danke ich für die theoretische und praktische Einführung in das Projekt 83.5 sowie in die Welt der Molekularbiologie.

Herrn Dr. Khanh Nguyen und seinen Mitarbeiterinnen danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit.

Frau Dr. Schwerdtfeger danke ich sehr für die äußerst gute und freundschaftliche Zusammenarbeit, ihrer großen Hilfsbereitschaft und die zahlreichen anregenden Gespräche.

Frau Bartl-Zimmermann danke ich für die sehr gute Unterstützung im Labor und während der Praktika.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und Klaus Minol, die mir stets zur Seite standen.

Die experimentelle Durchführung der vorliegenden Arbeit erfolgte in der Zeit von September 1996 bis Mai 2000 am Institut für Biochemie des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Prof. Dr. H. G. Gassen.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Genregulation in Eukaryonten	3
2.2 Die Grundstruktur eines RNA Polymerase II Promotors	6
2.2.1 Struktur und Funktion der Kernpromotor Faktoren	9
2.3 Die basale Transkriptionsmaschinerie und die Initiation der Transkription	11
2.4 Regulatorische Transkriptionsfaktoren	15
2.4.1 Struktur motive der DNA-Bindungsdomänen	15
2.4.2 Transkriptionsaktivatoren	18
2.4.2.1 Coaktivatoren	19
2.4.2.2 Der Enhancer	20
2.4.3 Wirkungsmechanismen von Repressoren der Transkription	21
2.4.3.1 Silencer	24
2.4.4 Regulatorische Transkriptionsfaktoren bilden Module	25
2.5 Transkriptionelle Regulation im Nervensystem	26
2.5.1 Der RE-1 Silencer Transkriptionsfaktor	27
2.5.2 Stimulus-Transkriptions-Kopplung im Nervensystem	31
2.5.3 Stimulus-induzierte Aktivierung konstitutiver Transkriptionsfaktoren im Nervensystem	34
2.5.3.1 Der Transkriptionsfaktor CREB	34
2.5.3.1.1 Regulation der CREB-Aktivität durch Hormone und Neurotransmitter	36
2.5.3.1.2 Regulation der CREB-Aktivität durch Ca^{2+}	37
2.5.3.1.3 Die Rolle von CREB bei der Gedächtnisbildung	40
2.5.3.2 Die NF- κ B/Rel-Familie von Transkriptionsfaktoren	42
2.5.3.2.1 Struktur der Mitglieder der NF- κ B/I κ B Familie	42
2.5.3.2.2 Aktivierung von NF- κ B unter physiologischen und patho-physiologischen Bedingungen	44
2.5.3.2.3 Zielgene von NF- κ B/Rel-Transkriptionsfaktoren	46
2.5.4 Induzierbare Transkriptionsfaktoren des Nervensystems	48
2.5.4.1 Der Transkriptionsfaktor AP-1	48
2.5.4.1.1 Die AP-1 Mitglieder c-Fos und c-Jun	49
2.5.4.1.2 Regulation der Genexpression von c-Fos	50
2.5.4.1.3 Regulation der Genexpression von c-Jun	51
2.5.4.1.4 Regulation der c-Fos und c-Jun Proteinaktivitäten	51
2.5.4.1.5 Die biologische Wirkung von c-Fos und c-Jun im Nervensystem	53
2.5.5 Die Regulation der neuronalen Stressantwort: Integration regenerativer, apoptotischer und immunologischer Reaktionen	54
2.6 Anwendungsgebiete induzierbarer Promotoren – Regulation der Transgenexpression	56
2.6.1 Kontrolle der Gedächtnisbildung durch die regulierte Expression eines CAMK II-Transgens	60
2.7 Die Struktur des Gens 83.5	62

2.8 Zielsetzung und Strategie der Untersuchungen	65
3 MATERIALIEN UND METHODEN	67
3.1 Materialien	67
3.1.1 Chemikalien	67
3.1.2 Spezielle Materialien und Geräte	68
3.1.3 Zellkulturmaterialien	69
3.1.4 Enzyme und Proteine	69
3.1.5 Nukleotide und DNA	70
3.1.6 Nährmedien	70
3.1.7 Lösungen und Puffer	71
3.1.8 Zellkulturmedien und Supplemente	71
3.1.9 Puffer, Lösungen und Mediensupplemente für die Zellkultur	72
3.1.10 DNA-Größenstandard	72
3.1.11 Bakterienstämme	73
3.1.12 Plasmidvektoren	74
3.1.12.1 pBluescript II SK(-)	74
3.1.12.2 pGL3-Basic Luciferase Reportervektor	74
3.1.12.3 pRL-TK Luciferase Kontrollvektor	75
3.1.12.4 pGEM-T Vektor	76
3.1.12.5 pCMV β Vektor	76
3.1.13 Zelllinien	77
3.1.14 Oligonukleotide	77
3.1.14.1 Band-Shift-Oligonukleotide	78
3.1.14.2 PCR- und Sequenzier-Primer	80
3.2 Methoden	82
3.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden	82
3.2.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> -Stämmen	82
3.2.3 Transformation von Bakterien	82
3.2.3.1 Herstellung von transformationskompetenten <i>E. coli</i> DH5 α und XL1-Blue Zellen	82
3.2.3.2 Herstellung von transformationskompetenten <i>E. coli</i> JM109 Zellen	83
3.2.3.3 Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α und XL1-Blue Zellen	84
3.2.3.4 Transformation von <i>E. coli</i> JM109 Zellen	85
3.2.4 Präparation von Plasmid-DNA	85
3.2.4.1 Analytische Plasmidisolierung	85
3.2.4.2 Präparative Plasmidisolierung	86
3.2.5 Reinigung von Nukleinsäuren	87
3.2.5.1 Phenolextraktion	87
3.2.5.2 Ethanol- und Isopropanolfällung	87
3.2.5.3 Reinigung über das QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen	87
3.2.5.4 Reinigung radioaktiv markierter DNA-Fragmente und Oligonukleotide über das QIAquick Nucleotid Removal Kit von Qiagen	88
3.2.5.5 Gelpermeationschromatographie zur Abtrennung freier Nukleotide	88
3.2.6 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	89
3.2.6.1 Elution mit β -Agarase I	89
3.2.6.2 Elution über silikonisierte Glaswolle	89
3.2.7 Radioaktive Markierung von DNA	90
3.2.7.1 5'-Phosphorylierung mit γ - 32 P-ATP	90
3.2.7.2 Radioaktive Markierung mit dem Klenow-Fragment	90
3.2.8 Enzymatische Modifikation von DNA	91
3.2.8.1 Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen	91

3.2.8.2 5'-Dephosphorylierung von DNA	91
3.2.8.3 Ligation von DNA-Fragmenten	91
3.2.9 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion	91
3.2.10 Insertionsverkürzung rekombinanter Plasmid-DNA (Nested Deletion)	92
3.2.11 DNA-Sequenzierung	94
3.2.11.1 DNA-Sequenzierung nach Sanger	94
3.2.11.2 Maxam-Gilbert A+G Sequenzierreaktion	94
3.2.12 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren	95
3.2.12.1 Native Agarose-Gelelektrophorese von DNA	95
3.2.12.2 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA	95
3.2.12.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA	97
3.2.13 Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	97
3.2.14 Präparation von RNA aus Gewebe	98
3.2.15 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch <i>Primer Extension</i>	99
3.2.16 Präparation von Kernproteinen	100
3.2.16.1 Isolierung von Zellkernen und Extraktion von Kernproteinen aus Säugerzellkulturen	100
3.2.16.2 Isolierung von Zellkernen und Extraktion von Kernproteinen aus Gewebe	102
3.2.16.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	103
3.2.16.4 DAPI-Färbung der Zellkerne	103
3.2.17 Band-Shift-Analysen und Kompetitionstest	103
3.2.17.1 Hybridisierung von Oligonukleotiden: Herstellung von Band-Shift Sonden	103
3.2.17.2 <i>In vitro</i> DNA-Protein-Bindungsreaktion	104
3.2.17.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese von DNA-Protein-Komplexen	105
3.2.18 DNase I Footprinting Analyse	106
3.2.19 Kultivierung von Säugerzellen	108
3.2.19.1 Herstellung von Medien für die Zellkultivierung	108
3.2.19.2 Kryokonservierung und Auftauen von Säugerzellen	108
3.2.19.3 Beschichtung von Kulturgefäßen	109
3.2.19.4 Bestimmung der Zellzahl durch den Trypanblau-Ausschlusstest	109
3.2.19.5 Kultivierung und Subkultivierung der Fibroblastenzelllinie BHK 21	110
3.2.19.6 Kultivierung und Subkultivierung der Phäochromocytom-Zelllinie PC-12	110
3.2.19.7 Kultivierung und Subkultivierung der Neuroblastomazelllinie Neuro-2a	111
3.2.19.8 Kultivierung und Subkultivierung der Neuroblastomazelllinie SK-N-SH	111
3.2.20 Transfektion von Säugerzellen	112
3.2.20.1 Lipofektion der BHK 21 Zellen mit DDAB	112
3.2.20.1.1 Herstellung der Liposomen	112
3.2.20.1.2 Lipofektion der BHK 21 Zellen	112
3.2.20.2 Transfektion mit kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien	112
3.2.20.2.1 Transfektion der Neuro-2a und SK-N-SH Zellen mit FuGENE™ 6	113
3.2.20.2.2 Transfektion der PC-12 Zellen	113
3.2.20.2.3 Nachweis der β -Galactosidaseaktivität mittels X-gal-Färbung und Bestimmung der Transfektionseffizienz	114
3.2.20.3 Aufschluss von Säugerzellen	114
3.2.20.4 Messung der Reportergenaktivitäten	115

4 ERGEBNISSE 117

4.1 Identifizierung repetitiver Sequenzen im Gen 83.5 117

4.2 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes 118

4.2.1 Prinzip der <i>Primer Extension</i>	119
4.2.2 Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus Schweinegehirn	120
4.2.3 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch <i>Primer Extension</i>	122

4.3 Analyse der Promotorregion <i>sp</i> 83.5 auf potenzielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren	126
4.4 Sequenzvergleich der mRNA <i>sp</i>, <i>tmp</i> 83.5 und des Gens 83.5	127
4.4.1 Sequenzvergleich der mRNA <i>sp</i> 83.5	127
4.4.2 Sequenzvergleich des Gen 83.5	128
4.4.3 Sequenzvergleich der mRNA <i>tmp</i> 83.5	129
4.5 Identifizierung funktioneller Elemente des Promotors <i>tmp</i> 83.5	132
4.5.1 Konstruktion von Promotortestplasmiden	132
4.5.1.1 Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 1.700	134
4.5.1.2 Konstruktion der Promotortestplasmide pProm 1.350, 970, 770, 590, 500 und 260 über <i>Nested Deletion</i> des pProm 1.700	136
4.5.1.3. Konstruktion der Promotortestplasmide pProm 160, 100 und 80 aus dem pProm 260	139
4.5.1.3.1 Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 160	139
4.5.1.3.2 Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 100	140
4.5.1.3.3 Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 80	141
4.5.1.4 Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 2.080	141
4.5.1.5 Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 4.350	143
4.5.1.6 Konstruktion des Wildtyp-Promotors einschließlich der 5'-nichttranslatierten Region pProm 4.350/UTR	145
4.5.1.7 Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 100/UTR	148
4.5.2 Charakterisierung der konstruierten Promotortestplasmide nach Restriktionsanalyse	149
4.5.3 Charakterisierung der Promotortestplasmide durch DNA-Sequenzierung	151
4.6 Transiente Transfektion der Promotortestplasmide in die Zelllinien BHK 21, SK-N-SH und Neuro-2a	153
4.6.1 Messung der Reporterogenaktivitäten	155
4.6.1.1 Berechnung der relativen Luciferase-Aktivität	156
4.6.2 Transiente Transfektion der Fibroblastenzelllinie BHK 21	156
4.6.3 Transiente Transfektion der humanen Neuroblastomazelllinie SK-N-SH	160
4.6.4 Transfektion der murinen Neuroblastomazelllinie Neuro-2a	163
4.6.5 Transfektion der Phäochromocytom Zelllinie PC-12 aus Ratte	166
4.7 DNase I Footprinting Analyse des Promotors <i>tmp</i> 83.5 von Position –260 bis +24	167
4.7.1 Prinzip des DNase I Footprintings	167
4.7.2 DNase I Footprinting Analyse der Promotorregion –138 bis +24	169
4.7.2.1 Präparation des codierenden Stranges	169
4.7.2.2 Präparation des nichtcodierenden Stranges	169
4.7.3 DNase I Footprinting Analyse des codierenden und nichtcodierenden Stranges des Promotorbereichs –138 bis +24	170
4.7.4 DNase I Footprinting Analyse der Promotorregion –252 bis –71	174
4.7.5 Korrelation der DNase I Footprinting Bindestellen zu bekannten Bindestellen für Transkriptionsfaktoren	178
4.8 Band Shift Analysen	180
4.8.1 Prinzip der Band Shift Analyse	180
4.8.2 Durchführung der Band Shift Analysen der Promotorregion –258 bis +24	181
4.8.3 Band Shift Analyse der Promotorregion +3 bis +24	183
4.8.3.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs +3 bis +24 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen	186
4.8.4 Band Shift Analyse der Promotorregion +6 bis –29	186
4.8.4.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs +6 bis -29 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen	188

4.8.5 Band Shift Analyse der Promotorregion -28 bis -61	188
4.8.5.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs -28 bis -61 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen	189
4.8.6 Band Shift Analyse der Promotorregion -75 bis -95	190
4.8.7 Band Shift Analyse der Promotorregion -94 bis -128	191
4.8.7.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs -94 bis -128 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen	192
4.8.8 Band Shift Analyse der Promotorregion -129 bis -162	193
4.8.8.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs -129 bis -162 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen	194
4.8.9 Band Shift Analyse der Promotorregion -160 bis -183	195
4.8.9.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs -160 bis -183 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen	196
4.8.10 Band Shift Analyse der Promotorregion -184 bis -208	197
4.8.10.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs -184 bis -208 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen	198
4.8.11 Band Shift Analyse der Promotorregion -207 bis -229	199
4.8.11.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs -207 bis -229 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen	200
4.8.12 Band Shift Analyse der Promotorregion -230 bis -258	201
5 DISKUSSION	203
5.1 Der Startpunkt der Transkription für die Synthese der mRNA <i>sp</i> 83.5	203
5.2 Der Promotor <i>sp</i> 83.5	205
5.3 Analyse der Promotorregion <i>tmp</i> 83.5 auf Elemente mit funktioneller Bedeutung für die Transkription	208
5.3.1 Deletionsstudie in der Zelllinie Neuro-2a	210
5.3.2 Deletionsstudie in der Zelllinie SK-N-SH	213
5.3.3 Vergleich der Expressionsmuster in den untersuchten neuronalen Zelllinien	214
5.3.4 Deletionsstudie in der Zelllinie BHK21	216
5.3.5 Vergleich der Deletionsstudien in den untersuchten Zelllinien	216
5.4 Untersuchung des Promotors <i>tmp</i> 83.5 auf Sequenzhomologien zu bekannten Repressoren der Transkription	218
5.5 Untersuchung des Promotors <i>tmp</i> 83.5 auf bekannte Promotor-Module	221
5.6 Untersuchung des Kern- und proximalen Promotors <i>tmp</i> 83.5	226
5.7 Regulation der neuronspezifischen Transkription	232
5.7.1 Bedeutung des NRSE für die neuronspezifische Regulation der Transkription	232
5.8 Regulationsmodell für die Expression der mRNA <i>tmp</i> des Gens 83.5	234
5.9 Ausblick	237
6 LITERATURVERZEICHNIS	239
7 ANHANG	252
7.1 Sequenz des Gens 83.5	252
7.2 Die Promotorregion pProm 4.350/UTR	256

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A _x	Absorption bei einer Wellenlänge von x nm
Amp	Ampicillin
<i>amp</i>	Ampicillinresistenzgen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
Bindesilan	γ-Methacryloxypropyltrimethoxysilan
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	copy DNA (zur RNA komplementäre DNA)
cfu	colony forming units (Kolonie-bildende Einheiten)
Ci	Curie
CIP	Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm
cpm	counts per minute (radioaktive Zerfälle pro Minute)
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DDAB	Dimethyldioctadecylammoniumbromid
ddNTP	2', 3'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycol-O,O'-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
fl	Phagenreplikationsursprung
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
GTFs	allgemeine Transkriptionsfaktoren (general transcription factors)
GuSCN	Guanidiniumisothiocyanat
G	Guanin
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
hnRNA	heterogenous nuclear RNA (heterogene Kern-RNA)
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
<i>lacI</i>	<i>lacZ</i> -Repressorgen

<i>lacZ</i>	β -Galaktosidasegen
LB	Luria Bertoni (Medium für die Kultivierung von Bakterien)
LPS	Lipopolysaccharide
mA	Milliampere
MEM	Minimum Essential Medium
Milli-Q-Wasser	Hochreines Wasser, durch eine Millipore-Wasseraufbereitungsanlage gereinigt
min	Minute
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (Boten-Ribonukleinsäure)
N	beliebiges Nukleotid in einer DNA-Sequenz
NGF	Nervenwachstumsfaktor (Nerve Growth Factor)
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
ori	Replikationsursprung
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphat buffered saline)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming units (Plaque-bildende Einheiten)
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Pol II	RNA Polymerase II
Poly (dI-dC)	Poly-(2'-desoxyinosinyl-2'-desoxycytidylsäure)
Repelsilan	Dimethyldichlorsilan
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTFs	regulatorische Transkriptionsfaktoren
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spermidin	N-(3-Aminpropyl)-1,4-diamino-butan
Spermin	N,N'-Bis-(3-aminopropyl)-1,4-diamino-butan
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Alkylphenylpolyethylenglykol
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
5'-UTR	5'-nichttranslatierte Region (5'-untranslated region)
3'-UTR	3'-nichttranslatierte Region (3'-untranslated region)
V	Volt
wt	Wildtyp
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

1 Zusammenfassung

Voraussetzung für die Leistungen unseres Gehirns wie Wahrnehmung, Erinnerung, koordinierte Bewegungsabläufe oder kognitive Leistungen ist die Ausbildung komplizierter neuronaler Netzwerke aus einer Vielzahl differenzierter Nervenzellen. Diese Netzwerke sind nicht statisch, sondern zeigen eine außerordentliche Plastizität, die auf einer Rückkopplung zwischen extraneuronalen Ereignissen und morphologisch-funktionellen Veränderungen der Neuronen und somit auf einem variablen Muster der Genexpression beruhen. Die Transkriptionskontrolle stellt hierbei den wichtigsten Regulationsmechanismus dar, der für eine räumlich und zeitlich koordinierte Phänotypausprägung notwendig ist. Durch die Aufklärung der molekularen Mechanismen der neuronalen Genexpression wurde in den letzten Jahren ein tieferes Verständnis verschiedener Gehirnfunktionen und -leistungen erhalten.

Bei der Suche nach Blut-Hirn-Schranke spezifischen Expressionsprodukten wurde im Vorfeld dieser Arbeit zwei bisher noch nicht beschriebene mRNA-Sequenzen (*tmp* 83.5 und *sp* 83.5) isoliert. *In situ* Hybridisierungen und immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass beide Transkripte in unterschiedlichen Neuronentypen der Groß- und Kleinhirnrinde des Schweins gebildet werden. Die Transkripte codieren höchstwahrscheinlich für ein noch nicht beschriebenes potenzielles Membranprotein (TMP 83.5) sowie für dessen lösliche Isoform (SP 83.5). Die mRNA-Sequenzen werden von einem 21,7 kb langen Gen (Gen 83.5) unter der Nutzung alternativer Promotoren gebildet. Der Transkriptionsstartpunkt für das Transkript *tmp* 83.5 wurde bereits bestimmt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Transkriptionsstartpunkt des zweiten Transkripts *sp* 83.5 mit Hilfe der Methode des *Primer Extension* bestimmt. Durch die Ermittlung der Startstelle konnte die gesamte mRNA-Sequenz *sp* 83.5 im 5'-Bereich ermittelt werden und die bisher bekannte Transkriptsequenz um 42 Nukleotide vervollständigt werden. Die Gesamtlänge der mRNA *sp* 83.5 umfasst nun 2.374 Nukleotide. Die computergestützte Untersuchung der Promotorregion auf Sequenz-homolgien zu bekannten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen ergab, dass diese zahlreiche Bindungsstellen neuronaler und gehirnspezifischer Transkriptionsfaktoren enthält.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Promotor *tmp* 83.5 analysiert. Zum Nachweis funktioneller regulatorischer Sequenzelemente im Promotor *tmp* 83.5 sowie in der 5'-nichttranslatierten Region (5'-UTR) wurde eine Serie von Promotortestplasmiden mit zunehmenden 5'-Deletionen des Wildtyp-Promotors *tmp* 83.5 generiert. Die Expressionsraten dieser Promotorvarianten wurden in zwei neuronalen Zelllinien aus Maus und Mensch sowie im Vergleich hierzu in einer nichtneuronalen Zelllinie (Hamster)

untersucht. Mit den Ergebnissen dieser Deletionsstudien konnten verschiedene funktionelle Bereiche im Promotor eingegrenzt werden, die für eine zellspezifische bzw. allgemeine Aktivierung respektive Repression des Gens 83.5 verantwortlich sind.

Mit DNase I Footprinting Experimenten und Band Shift Untersuchungen konnten *in vitro* sequenzspezifische Protein-Bindungen im Bereich des Kern- und proximalen Promotors *tmp* 83.5 nachgewiesen werden. Innerhalb dieses Promotorbereiches wurden mittels Datenbankabgleich eine Reihe von Bindungsstellen bereits bekannter Transkriptionsfaktoren gefunden. Dabei zeigte sich, dass dieser Bereich eine hohe Zahl von gehirn- bzw. neuronspezifischer Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen aufweist. Am Transkriptionsstartpunkt konnte ein Initiatorelement zugeordnet werden. Die Region 25 bis 30 bp stromaufwärts der Startstelle weist keine TATA-Box auf. Weitere typische Sequenzelemente für eine konstitutive und ubiquitäre Expression wurden ebenfalls nicht identifiziert. Die Promotorstruktur gleicht damit anderen neuronal exprimierten Genen und steht im Einklang mit der experimentell nachgewiesenen neuronspezifischen Expression des Gens 83.5.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse wurde ein Modell für die Regulation des Promotors *tmp* 83.5 aufgestellt. Es umfasst neben eines ubiquitären Enhancers in der 5'-nichttranslatierten Region einen neuronspezifischen Aktivator und Repressor im distalen Promotor sowie Bindungsstellen für induzierbare und neuronspezifische Transkriptionsfaktoren im proximalen Promotor.

Basierend auf der Entschlüsselung des humanen Genoms ermöglichten Datenbankabgleiche schließlich die Identifizierung der humanen Genvariante von 83.5 sowie die korrespondierende mRNA *tmp* 83.5. Interessanterweise ist das humane Gen auf Chromosom 10 in einem Bereich lokalisiert, der im engen Zusammenhang mit neuronalen Fehlfunktionen, z.B. einer erblichen Variante der Epilepsie, zu stehen scheint.

2 Einleitung

2.1 Genregulation in Eukaryonten

Die Entwicklung eines multizellulären Organismus von der Befruchtung bis zur sexuellen Reife und die damit einhergehende Differenzierung seiner Zellen ist ein hochkomplexer Prozess, der auf einer zeitlich und räumlich geordneten Kontrolle der Genaktivitäten beruht. Aus einer einzigen befruchteten Eizelle, der Zygote, resultiert letztendlich ein Lebewesen mit komplexen Organen, die sich aus einer Vielzahl hochspezialisierter Zelltypen zusammensetzen. Alle Zelltypen haben den gleichen Genotyp, d.h. sie alle enthalten das gleiche genetische Material in Form der DNA. Der Phänotyp und die Funktion jeder Zelle wird von Art und Menge der darin enthaltenen Proteinen bestimmt. Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse sind demnach durch ein variables Muster der Genexpression charakterisiert. Die Synthese der Proteine und deren Regulation erfolgt nach einem in allen Organismen identischen Weg (Abb. 1). Er beginnt mit der Transkription, in der die auf dem codierenden Bereich des Gens, dem Strukturgen, gespeicherte Information in einzelsträngige RNA (mRNA) umgeschrieben wird. Anschließend wird in dem Vorgang der Translation die RNA-Matrize in die entsprechende Proteinsequenz übersetzt. Wenn die Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen eines Organismus auf der Expression bestimmter Gene beruhen, stellt sich nun die Frage, auf welcher Ebene der Genexpression die Regulation erfolgt.

Im Prinzip kann die Regulation der Genexpression in jedem Schritt auf dem Weg von der DNA zum Protein erfolgen (Abb. 1; Alberts et al., 1995). Die Zelle kann die Qualität und Quantität der von ihr synthetisierten Proteine regulieren, indem sie über die Chromosomenstruktur und den Transkriptionsapparat die Transkriptionshäufigkeit beeinflusst (Transkriptionskontrolle, 1 und 2). Sie kann festlegen, wie das primäre RNA-Transkript (hnRNA) gespleißt oder auf andere Weise verändert wird (RNA-Prozessierungs-Kontrolle, 3) oder auswählt, welche fertiggestellten mRNAs vom Zellkern ins Cytoplasma exportiert werden (RNA-Transport-Kontrolle, 4). Ein weiterer Mechanismus reguliert, welche mRNA-Spezies im Cytoplasma destabilisiert werden (mRNA-Abbau-Kontrolle, 5) oder welche mRNAs im Cytoplasma durch Ribosomen translatiert werden (Translations-Kontrolle, 6). Schließlich kann die Zelle selektiv spezifische Proteinmoleküle nach ihrer Synthese aktivieren, inaktivieren oder räumlich abgrenzen (Protein-Aktivitäts-Kontrolle, 7).

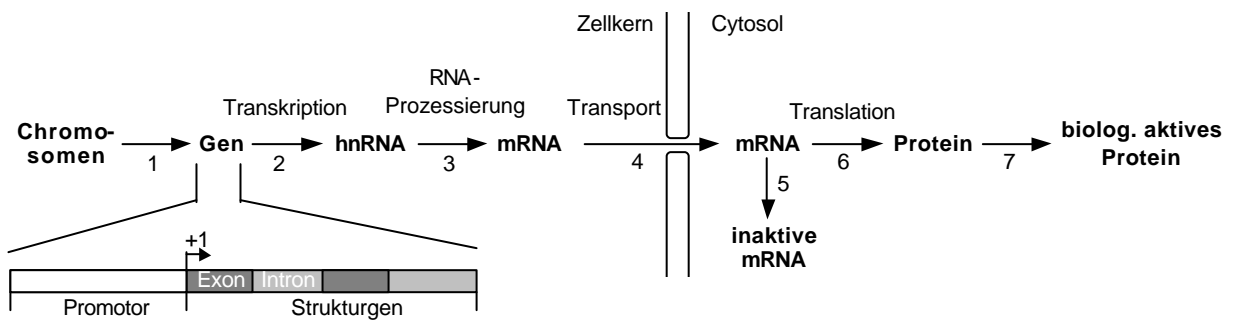


Abb. 1 Der genetische Informationsfluss und die Ebenen der Regulation der eukaryontischen Genexpression.

Jedes Gen besteht aus einer Promotorregion und dem Strukturgen. Der Übergang von Promotor zu Strukturgen wird durch den Transkriptionsstartpunkt +1 gekennzeichnet, von dem aus die RNA-Synthese durch die RNA Polymerase II beginnt. Die zunächst gebildete heteronukleäre RNA (hnRNA) besteht aus proteincodierenden sowie nichtcodierenden Sequenzen (Exons und Introns) und wird durch Entfernung der Introns in die reife Boten RNA (mRNA) überführt. Nach Transport der mRNA in das Cytosol der Zelle wird die mRNA im Vorgang der Translation in Protein übersetzt. Die Regulation der Genexpression kann auf mehreren Ebenen erfolgen: (1 und 2) Transkriptions-Kontrolle, (1) Chromatin-Umgestaltung, (2) Transkriptions-Initiation; (3) RNA-Prozessierungs-Kontrolle; (4) RNA-Transport-Kontrolle; (5) mRNA-Abbau-Kontrolle; (6) Translations-Kontrolle; (7) Protein-Aktivitäts-Kontrolle.

Obwohl im Prinzip alle Schritte, die an der Genexpression beteiligt sind, reguliert werden können, ist die Regulation der Transkription der für die zeitliche und räumliche koordinierte Zelldifferenzierung und Phänotypausprägung wichtigste Schritt. Dies macht vor allem deshalb Sinn, weil nur die Transkriptions-Kontrolle sicherstellt, dass keine überflüssigen Zellbestandteile synthetisiert werden.

Das Genom einer Zelle enthält in seiner DNA-Sequenz die Information zur Herstellung vieler Tausend verschiedener Protein- und RNA-Moleküle. Einen Teil dieser Information benötigt die Zelle ständig; die meisten Zellen synthetisieren zum Beispiel permanent Ribosomen und müssen daher kontinuierlich rRNA und ribosomale Proteine synthetisieren. Auch Gene, die für Enzyme wie RNA-Polymerase codieren oder solche, die an grundlegenden Stoffwechselwegen mitwirken, sind in allen Zellen immer aktiv. Da diese Gene ständig für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion gebraucht werden, nennt man sie konstitutive Gene oder Haushaltsgene (engl. housekeeping genes). Im Gegensatz dazu haben viele Gene eine speziellere Aufgabe und ihre biologische Information benötigt die Zelle nur unter ganz bestimmten Umständen. Alle Organismen können deshalb die Transkription ihrer Gene so regulieren, dass die Gene, deren RNA oder Protein nicht erforderlich sind, abgeschaltet werden.

Der Mechanismus der Transkription erfordert eine Vielzahl von intrazellulären Protein-DNA- und Protein-Protein-Wechselwirkungen. Betrachtet man den allgemeinen Aufbau von Genen, so besteht jedes Gen aus einer Kontrollregion, dem Promotor, und einem

Strukturgen (Abb. 1). Das Strukturgen enthält die genetische Information für den Aufbau des von ihm codierten Proteins. Das 5'-Ende des Strukturgens ist der Transkriptionsstartpunkt, von dem aus die Transkription durch die RNA-Polymerase II beginnt. Diese Position in der Gensequenz wird per Definition +1 bezeichnet. Der Promotor stellt den regulatorischen Genabschnitt der Transkription dar, der sich vom Startpunkt der Transkription in 5'-Richtung erstreckt und selbst nicht transkribiert wird.

Innerhalb des Promotors befinden sich Bindungsstellen für spezielle regulatorische Proteine, die sogenannten regulatorischen Transkriptionsfaktoren (RTF). Diese binden hochspezifisch an bestimmte DNA-Sequenzmotive (cis-Elemente) des Promotors, die in der Regel zwischen 4 bis 20 Nukleotide umfassen. Oftmals sind diese Sequenzen als Palindrom aufgebaut. Zu Beginn der Transkription bildet sich somit ein großer Komplex, der aus der DNA, zahlreichen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase besteht.

Während bei Prokaryonten eine einzige DNA-abhängige RNA-Polymerase die Synthese aller RNA-Typen katalysiert, existieren in Eukaryonten drei RNA-Polymerasen, die jeweils verschiedene Genklassen transkribieren. Die RNA-Polymerase I transkribiert Gene der Klasse I, die für die großen ribosomalen RNAs (5,8S-, 18S- und 28S-rRNA) codieren. Die RNA-Polymerase II synthetisiert alle proteincodierenden mRNAs und eine Vielzahl kleiner Kern-RNAs (snRNA), die von proteincodierenden Genen der Klasse II codiert werden. Die tRNAs, die 5S-rRNA und kleine cytoplasmatische RNAs (scRNA) werden von der RNA-Polymerase III transkribiert (Lewin, 1994). Im Folgenden werden die Strukturen und unterschiedlichen Regulationsmechanismen der Transkription der proteincodierenden Gene der Klasse II beschrieben.

Im Gegensatz zur prokaryontischen RNA-Polymerase ist die eukaryontische RNA-Polymerase II an sich nicht in der Lage, Promotorregionen selbstständig zu erkennen und die Transkription zu initiieren. Für diesen Vorgang benötigt sie spezielle DNA-Bindeproteine, sogenannte allgemeine Transkriptionsfaktoren (GTF = general transcription factor). Die allgemeinen Transkriptionsfaktoren bilden einen Komplex mit der RNA Polymerase II, der als basaler Transkriptionsapparat bezeichnet wird. Sie positionieren die RNA-Polymerase II präzise am Startpunkt der Transkription. Regulatorische Transkriptionsfaktoren (RTF) hingegen binden an ihre jeweilige Erkennungssequenz im Promotor und regulieren die Transkriptionsrate über direkte oder indirekte Wechselwirkungen mit den GTFs der basalen Transkriptionsmaschinerie. Auf diese Weise aktivieren oder reprimieren sie die Transkriptionsinitiation.

In den folgenden Abschnitten (2.2 bis 2.4.4) werden zunächst die generellen Transkriptionsmechanismen sowie die Struktur und Funktion von Transkriptionsfaktoren beschrieben. Die Abschnitte 2.5 bis 2.6 beschreiben anschließend beispielhaft einige Mechanismen der differentiellen Transkriptionskontrolle, die zu einer gewebespezifischen

Expression im Nervensystem führen sowie Anwendungsgebiete gewebespezifischer Promotoren.

2.2 Die Grundstruktur eines RNA Polymerase II Promotors

Der genomische Locus eines von der RNA Polymerase II transkribierten Gens enthält eine Vielzahl regulatorischer Elemente, an die Transkriptionsfaktoren binden und damit eine korrekte zeitliche und zell- bzw. organspezifische differentielle Expression des Gens ermöglichen. Diese regulatorischen Elemente können sich in eukaryontischen Kontrolleinheiten der Transkription sowohl mehrere tausend Basenpaare stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt +1 als auch stromabwärts in die 5'-nichttranslatierte Region (5'-UTR) und in Intronbereichen des Strukturgens erstrecken. Ein schematisiertes Gesamtbild wichtiger regulatorischer Elemente eines Polymerase II Gens ist in Abbildung 2 dargestellt. Die chromosomale Domäne eines potenziell transkribierbaren Gens zeichnet sich durch eine geöffnete Chromatinstruktur aus. Die Begrenzung eines transkriptionell aktiven Gens wird durch Anheftungsstellen an die Kernmatrix festgelegt, die als sogenannte Scaffold/Matrix Anheftungsregionen (S/MAR) bezeichnet werden. Einen ebenfalls übergeordneten Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierbarkeit eines Gens nehmen die Locus Control Regionen (LCR) ein. Sie öffnen die Chromatinstruktur und ermöglichen den Zugang aller regulatorischen Proteine für die koordinierte Expression des Gens.

Die Sequenzmotive der einzelnen Gene der Klasse II variieren beträchtlich, jedoch zeigen die verschiedenen Promotoren in ihrer Grundstruktur einen gemeinsamen Aufbau, in denen drei Regionen unterschieden werden können (Werner, 1999). Diese Regionen werden als Kern-, proximaler und distaler Promotor bezeichnet und ihre Positionen in bezug auf den Startpunkt der Transkription mit +1 benannt (Abb. 2).

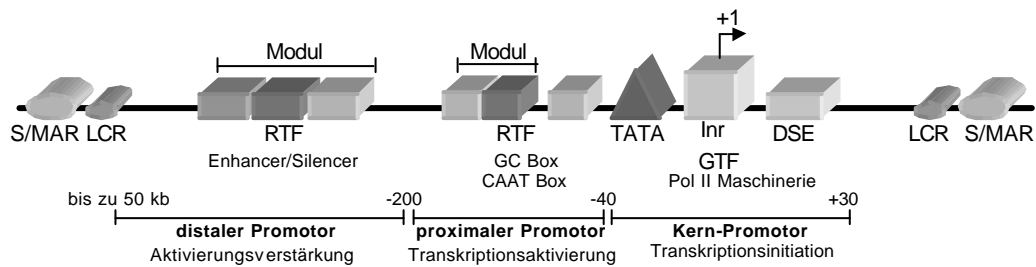


Abb. 2: Schematische Darstellung der Grundstruktur eines RNA Polymerase II Promotors.

Ein typischer eukaryontischer RNA-Polymerase II Promotor unterliegt multiplen regulatorischen Elementen. Entsprechend ihrer Entfernung vom Transkriptionsstartpunkt +1 wird der Promotor als Kernpromotor, proximaler und distaler Promotor bezeichnet. Die TATA-Box, der Initiator (Inr) und das „Downstream Element“ (DSE) sind Kernpromotor-Elemente, die den Startpunkt der Transkription (+1) festlegen. An den proximalen und distalen Promotor binden regulatorische Transkriptionsfaktoren (RTF), die häufig in Modulen organisiert sind. Die übergeordneten regulatorischen Elemente „Scaffold/Matrix Attachment Regions“ (MARs) und „Locus Control Regions“ (LCRs) grenzen eine Chromatindomäne mit aufgelockerter Chromatinstruktur ein. Die Polymerase II Maschinerie interagiert mit den allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTF) im Kern-Promotor und bildet so den RNA Polymerase II Holoenzym-Komplex aus.

Der Sequenzbereich von -40 bis $+30$ wird als Kernpromotor bezeichnet, da hier neben der Polymerase II auch alle allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTFs) binden, die für die Initiation der Transkription erforderlich sind. Elemente des Kernpromotors kontrollieren die Direktionalität der Transkription, legen den Transkriptionsstartpunkt präzise fest und antworten auf nahegelegene oder distale Aktivoren und Repressoren in der Zelle. Die Kernelemente sind der Initiator (Inr), das stromabwärts gelegene Sequenzelement (DSE, downstream sequence element), die TATA-Box und das Sequenzelement BRE. Die TATA-Box ist ein konserviertes Promotorelement mit der Konsensussequenz $5'-TATAA(A/T)A(A/T)-3'$, das sich in den meisten Promotoren wiederfindet. Sie positioniert über den gebundenen Transkriptionsfaktor TFIID den Initiationskomplex am Startpunkt, bestimmt dessen Lage und vermittelt die Wirkung weiter stromaufwärts gelegener Transkriptionsfaktoren auf den Initiationskomplex (siehe Abschnitt 2.2.1 und 2.4, Burley und Roeder, 1996).

Das Initiatorelement (Inr), der den Transkriptionsstartpunkt bis etwa zur Position $+20$ umgibt, ist ein kurzes und wenig konserviertes Element, mit der Konsensussequenz $5'-(T/G)CA(G/T)T-3'$ (Kraus et al., 1996). Der Initiator übernimmt dieselbe Funktion wie die TATA-Box, die Positionierung des Initiationskomplexes an den Startpunkt der Transkription (insbesondere bei Genen, die keine konventionelle TATA-Box enthalten; Goodrich et al., 1996).

Das DSE ist eine 7 Basenpaare lange Sequenz mit der Konsensussequenz $5'-RG(A/T)CGTG-3'$, die sich ungefähr 30 bp stromabwärts von der Startstelle befindet (Burke und Kadonaga, 1997). Die Funktion der TATA-Box, des Initiators und DSE sowie die Initiation der Transkription von Promotoren ohne TATA-Box und/oder Initiator im Kernpromotor wird im Abschnitt 2.2.1 näher erläutert.

Ein weiteres Kernpromotorelement ist die TFIIB Erkennungssequenz BRE (Lagrange et al., 1998). TFIIB gehört zu den allgemeinen Transkriptionsfaktoren und bindet an eine GC-reiche Sequenz 5'-(G/C)(G/C)(G/A)CGCC-3' an Position -32 bis -38, unmittelbar stromaufwärts der TATA-Box. Dieses Element ist in einer Vielzahl von eukaryontischen Kernpromotoren enthalten. Die Funktion des TFIIB wird im Zusammenhang mit der basalen Transkriptionsmaschinerie in Abschnitt 2.3 beschrieben.

Der Kernpromotor und der gebundene RNA Polymerase II Initiationskomplex kann alleine nur eine geringe Transkriptionsrate ermöglichen. Eine Transkriptionsaktivierung und -verstärkung wird über die regulatorischen Transkriptionsfaktoren des proximalen und distalen Promotors erreicht.

Direkt an den Kernpromotor schließt sich stromaufwärts der sogenannte proximale Promotorbereich an. Dieser Bereich reguliert die Transkriptionsrate, d.h. er aktiviert die Transkriptionsinitiation und ist im allgemeinen nicht weiter als ca. 200 Nukleotide von der Startstelle entfernt (Abb. 2). An den proximalen Promotor binden sequenzspezifisch regulatorische Transkriptionsfaktoren (RTF). Diese RTFs können entweder direkt oder indirekt mit dem Initiationskomplex wechselwirken und die Transkriptionsrate regulieren, d.h. aktivierend oder reprimierend auf die Initiation wirken.

Zwei Sequenzelemente, die in vielen Genen mit unterschiedlichen Expressionsmustern vorliegen und die basale Promotoraktivität stimulieren, sind die GC- und CAAT-Box (Zawel und Reinberg, 1995). Die GC-Box ist eine GC-reiche Sequenz mit der Konsensussequenz 5'-GGGCGG-3', die in mehreren Kopien und in unterschiedlicher Orientierung relativ zum Transkriptionsstartpunkt vorkommen kann. Das Sequenzmotiv ist Bindungsstelle für den ubiquitären Transkriptionsfaktor SP1, der in allen Zelltypen präsent ist.

Das CAAT-Motiv ist Erkennungsstelle für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise das CTF-Protein, das zur CTF/NF-1 Familie CAAT-bindender Proteine gehört (Johnson und McKnight, 1989).

Einige Promotoren, wie das Hitzeschock-Gen 70, enthalten beide Elemente. Andere, wie der Metallothionein-Promotor, tragen einzelne oder mehrere Kopien von dem einen oder anderen Motiv. In jedem Fall tragen alle bekannten Promotoren mindestens eins dieser Kontrollelemente, die für die Transkriptionsaktivität notwendig sind.

Im Bereich des proximalen Promotors können noch zahlreiche weitere Sequenzmotive für Aktivatoren oder Repressoren lokalisiert sein, vor allem Sequenzmotive, die eine gewebespezifische Expression oder hormonelle Kontrolle vermitteln.

An den proximalen Promotor schließt sich in 5'-Richtung der distale Promotor an. Der distale Promotor ist der variabelste Teil des Promotors sowohl in bezug auf die Zusammensetzung der Kontrollelemente als auch der Länge. Bindestellen für praktisch alle

bekannten Transkriptionsfaktoren sind hier zu finden, die eine verstärkende oder reprimierende Wirkung auf die Transkription ausüben und als Enhancer bzw. Silencer wirken. Ein definiertes 5'-Ende des Promotors gibt es nicht. Einige Promotoren sind wenige 100 Basenpaare lang, wohingegen andere sich über mehrere 1.000 Basenpaare erstrecken. Die am distalen Promotor gebundenen RTFs werden durch Faltung der lokalen Chromatinstruktur in die räumliche Nähe des Kern-Promotors gebracht und treten entweder direkt oder über Coaktivatoren respektive Corepressoren in Kontakt mit den GTFs der basalen Transkriptionsmaschinerie.

2.2.1 Struktur und Funktion der Kernpromotor Faktoren

Innerhalb des Kernpromotors (Abschnitt 2.2) befinden sich zwei wesentliche Sequenzmotive, die TATA-Box und der Initiator (Inr). Beide sind für eine korrekte Positionierung und die Aktivierung des RNA-Polymerase II Initiationskomplexes verantwortlich. Je nach dem Auftreten dieser beiden Elemente können vier verschiedene Kernpromotor-Strukturen unterschieden werden: Solche mit beiden Elementen (TATA+/Inr+), eines der beiden Elemente (TATA+/Inr- oder TATA-/Inr+) oder keines der beiden Elemente (TATA-/Inr-) im Kernpromotor. Die Kernpromotorstrukturen sind in Abbildung 3 dargestellt.

Promotoren, die weder eine TATA-Box noch ein Inr-Element tragen, sogenannte Null-Promotoren, haben vielfache Transkriptionsstartstellen. Die Initiation der Transkription ist hier ungenau. Die Bildung des Transkriptionskomplexes und der Mechanismus der Initiation bei dieser Klasse von Promotoren sind weitgehend unverstanden. Einige dieser Nullpromotoren mit multiplen Startstellen weisen einen hohen GC-Gehalt und mehrere Bindestellen für den ubiquitären Transkriptionsfaktor SP1 (Smale, 1994) auf. An diesen Promotoren, die häufig Haushaltsgene regulieren, vermittelt SP1 die Bildung des Präinitiationskomplexes an einer Region 40 bis 100 bp stromabwärts der Bindestelle. Andere Nullpromotoren tragen ein stromabwärts gelegenes Sequenzmotiv, das MED-1 (multiple startsite element downstream 1) mit der Hexanukleotidsequenz 5'-GCTCC(C/G)-3', das die Positionierung des Initiationskomplexes vermittelt (Novina und Roy, 1996).

Einige Promotoren enthalten zusätzlich zum Initiatorelement ein 7 Basenpaare langes DSE-Element mit der Konsensussequenz 5'-G(A/T)CGTG-3', das 30 bp von der Startstelle entfernt liegt. Dieses DSE-Element wird in *Drosophila* von den TBP-assoziierten Faktoren TAF_{II}60 und TAF_{II}40 gebunden und positionieren über TFIID den Initiationskomplex an den Startpunkt der Transkription (Burke und Kadonaga, 1997).

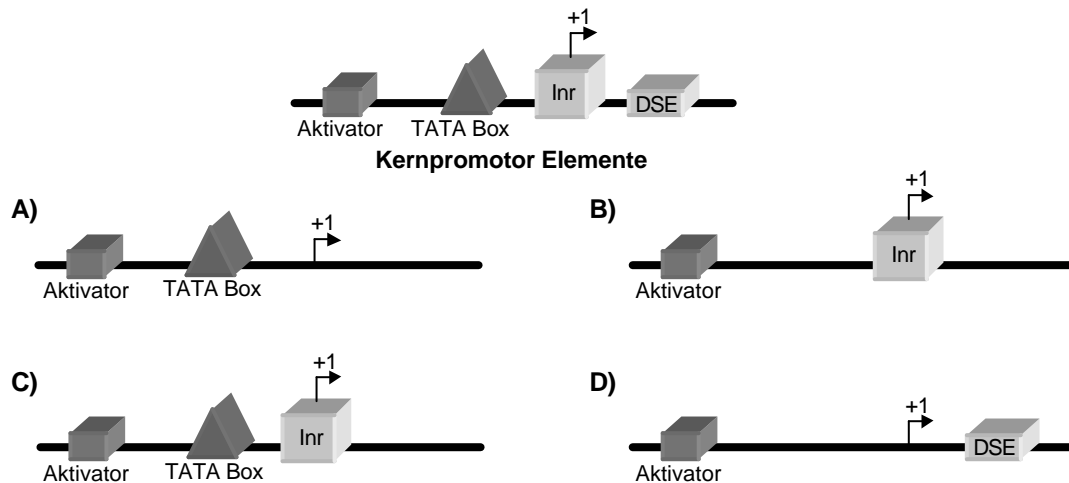


Abb. 3: Kernpromotor-Strukturen

Oben ist ein allgemeines Kern-Promotor Modul dargestellt. A) TATA+/Inr- Kernpromotor, B) TATA-/Inr+ Kernpromotor, C) TATA+/Inr+ Kernpromotor, D) TATA-/Inr- Kernpromotor, sogenannter Nullpromotor.

Tragen Promotoren eine TATA-Box, jedoch kein Initiatorelement, bestimmt die TATA-Box den Transkriptionsstartpunkt und vermittelt die Aktivierung der Transkription. Der entsprechende Transkriptionsfaktor ist das TATA-Box binding protein, TBP. Dieses Protein ist eine Untereinheit des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID und bildet mit 8 weiteren TAFs (TAFs, TBP associated factors) den Multiproteinkomplex TFIID. Aufgrund eines Netzwerkes kooperativer Protein-Protein-Wechselwirkungen des RNA Polymerase II Holoenzym mit TFIID wird ein Promotor-gebundener Aktivator an den Startpunkt dirigiert (Pugh, 2000). Die Richtung der Transkription ergibt sich aus der Orientierung des TBP an der TATA-Box.

Bei Promotoren mit Initiatorelement aber ohne TATA-Box übernimmt das Initiatorelement die Rolle der TATA-Box und legt den Startpunkt der Transkription präzise fest. Erkennt wird das Initiatorelement ebenfalls über Komponenten des TFIID-Komplexes. Jedoch bindet nicht TBP an das Initiatorelement, sondern die TAFs des TFIID-Komplexes, wahrscheinlich TAF_{II}150 (Smale, 1997). Durch die Bindung von TAF_{II}150 wird auch TBP an die Position -25 bis -30 dirigiert und assoziiert in einer TATA-Sequenz-unabhängigen Weise mit der DNA. Nach der Bindung des TFIID-Komplexes wird das RNA Polymerase II Holoenzym am Startpunkt ausgerichtet und die Transkription beginnt (siehe Abschnitt 2.3).

Ein weiteres Initiator-bindendes Protein ist der Transkriptionsfaktor YY1. Dieser regulatorische Transkriptionsfaktor, der sowohl als Aktivator als auch Repressor der Transkription wirken kann, dient bei mehreren Promotoren als Initiator der Transkription (Shi et al., 1997). Wie dieser Faktor die basale Transkriptionsmaschinerie an den Startpunkt dirigiert und die Initiation vermittelt, ist bisher nicht bekannt.

Die Kombination von TATA-Box und Initiator ist oftmals in viralen Promotoren zu finden, beispielsweise im Adenovirus Major Late Promotor. Untersuchungen an synthetischen Kernpromotoren mit TATA-Box und Initiatorelement und am Major Late Promotor zeigten, dass diese Sequenzelemente synergistisch wirken, wenn TFIID in Wechselwirkung mit TFIIA an diese Elemente bindet (Emami et al., 1997). Während TFIIA zusammen mit TFIID keinen verstärkenden Effekt auf Promotoren ausübt, die nur eine TATA-Box tragen, erhöht sich die Aktivität drastisch bei TATA+/Inr+ Promotoren. Auf welchen Mechanismus diese Verstärkung durch TFIIA beruht ist bisher nicht nachgewiesen.

2.3 Die basale Transkriptionsmaschinerie und die Initiation der Transkription

Die basale Transkriptionsmaschinerie ist ein komplexes Gebilde vieler Proteinkomponenten, bestehend aus RNA-Polymerase II, den allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTF, General Transcription Factor) TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH und TFIIJ sowie einem Komplex von Coaktivatoren und Corepressoren (Myer und Young, 1998).

Die RNA-Polymerase II selbst ist ein großer Multiproteinkomplex mit einer molaren Masse von mehr als 500 kDa. Sie besteht aus zwei großen Untereinheiten und bis zu zehn kleineren Untereinheiten. Eine wichtige Strukturkomponente der RNA-Polymerase II ist die C-terminale Domäne (CTD) der größten Polymeraseuntereinheit, die aus einer mehrfach wiederholten Heptapeptidsequenz YSPTSPS besteht. Die Serinreste dieser Heptapeptidfolge werden bei der Initiation der Transkription durch verschiedene Kinasen, die an der Transkriptionsregulation beteiligt sind, phosphoryliert. Daraus erklärt sich auch der Energiebedarf (ATP-Hydrolyse) der RNA Polymerase II zu Beginn der Transkription. Die GTFs unterstützen die basale Transkription und üben viele katalytische Funktionen für die Initiation aus. Sie bestehen ebenfalls aus mehreren Untereinheiten, so dass sich die basale Transkriptionsmaschinerie in beeindruckender Komplexität darstellt (Abb.4).

Den gesamten Proteinkomplex aus den verschiedenen RNA-Polymerase-Untereinheiten, den allgemeinen Transkriptionsfaktoren und den Coaktivatoren bezeichnet man als RNA Polymerase II Holoenzym (Myer und Young, 1998). Der Holoenzym-Komplex definiert mit seiner spezifischen Positionierung auf der DNA die Lage des Promotors und die exakte Initiationsstelle der Transkription, d.h. die Position +1 der RNA-Synthese.

An den Startpunkt der Transkription wird der Komplex über den allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIID herangeführt. Eine 38 kDa Untereinheit des TFIID, das TATA-Box bindende Protein (TBP), ist das einzige sequenzspezifische DNA-Bindungsprotein des basalen Transkriptionskomplexes. Die Bindung der TFIID-Untereinheit vermittelt also die exakte Positionierung der basalen Transkriptionsmaschinerie an den Transkriptions-

startpunkt. Als weitere Komponenten des TFIID-Komplexes sind an das TBP-Protein die sogenannten TAFs assoziiert (TAF = TBP assoziierte Faktoren). Inzwischen sind 8 verschiedene TAFs bekannt, die mit TBP interagieren und gemeinsam den Transkriptionsfaktor TFIID bilden. Das 180 Aminosäuren lange C-terminale Ende von TBP hat eine sattelförmige Struktur, dessen konkave Unterseite an die kleine Furche der DNA im Bereich der TATA-Box bindet. Die konvexe Oberfläche tritt in Wechselwirkung mit anderen Proteinen, wie regulatorische Transkriptionsfaktoren, den TAFs und den GTFs (Burley und Roeder, 1996). Die Bindung von TBP an die DNA leitet die schrittweise Assemblierung des Initiationskomplexes ein.

Die Stabilität der TBP-Bindung an die DNA wird durch die allgemeinen Transkriptionsfaktoren TFIIA und TFIIB erhöht. Beide kontaktieren sowohl TBP als auch die DNA. Die genaue Funktion von TFIIA ist nicht bekannt. Experimentelle Untersuchungen zeigen, dass er die Bindung von TBP an das TATA-Motiv stabilisiert, indem er den inhibierenden Effekt anderer Faktoren, die mit TBP wechselwirken, aufhebt (Zawel und Reinberg, 1995). TFIIB verbindet im Komplex TBP und die RNA-Polymerase II (Pol II). In dieser Funktion verhilft TFIIB der Pol II, ihre Positionierung ca. 25 Basenpaare stromabwärts der TATA-Box einzunehmen. Unterstützt wird die Bindung durch den Faktor TFIIIF, der an die Pol II assoziiert ist. Dieser Komplex ist jedoch noch nicht in der Lage die Transkription einzuleiten. Zwei weitere GTFs, TFIIIE und TFIIH, müssen in den Komplex eintreten, die RNA-Polymerase II modifizieren und dadurch die Initiation der Transkription auslösen. TFIIH ist der einzige GTF, der enzymatische Aktivität besitzt. Es ist ein Multiproteinkomplex variabler Zusammensetzung, der eine ATPase-, eine Helicase- und eine Proteinkinaseaktivität enthält. Die Kinase-Aktivität von TFIIH phosphoryliert die carboxyterminale Domäne (CTD) der Polymerase II. Durch die Hyperphosphorylierung der CTD wird die Verankerung der Polymerase II am Startpunkt des Promotors gelöst und die Transkriptionselongation beginnt. Die mit der Phosphorylierung einhergehende Anhäufung von negativen Ladungen an der CTD führt zur Aufhebung der Wechselwirkungen zwischen TBP und RNA Polymerase II. Dadurch wird die RNA Polymerase II aus dem Holoenzym-Komplex freigesetzt und in den Elongationsprozess entlassen.

Eine zusätzliche Bedeutung für die Transkription hat TFIIH in Form seiner enzymatischen Aktivität als Helikase/ATPase. Diese Aktivität führt zur Entwindung der DNA-Doppelhelix im Verlauf der Initiation und Elongation der Transkription. TFIIIE bindet nach der Entwindung der DNA an die Einzelstränge, um diese zu stabilisieren (Holstege et al., 1997).

Der Transkriptionsfaktor TFIIIF erhöht die Elongationsrate. Dieser stimulierende Effekt des aus zwei Untereinheiten bestehenden TFIIIF auf die Elongation wird durch

Phosphorylierung der 74 kDa Untereinheit (RAP74) wesentlich verstärkt. Phosphoryliert wird TFIIF durch die Kinaseaktivität der TFIID Komponente TAF_{II}250. Die RAP74-Untereinheit von TFIIF induziert wiederum Konformationsänderungen im Präinitiationskomplex, wodurch die RNA-Polymerase II in näheren Kontakt zum Promotor gebracht wird (Forget et al., 1997). Weiterhin ist TFIIF direkt mit der RNA-Polymerase II assoziiert, wodurch die Bildung des Präinitiationskomplexes verstärkt wird. TFIIJ ist ein 45 kDa Protein, dessen Funktion bisher nicht charakterisiert ist.

Das beschriebene Modell, demzufolge der Aufbau des gesamten Initiationskomplexes stufenweise aus den einzelnen GTF-Bausteinen erfolgt, leitet sich aus Experimenten ab, bei denen schrittweise gereinigte Faktoren und DNA *in vitro* kombiniert und deren Assoziation untersucht bzw. die jeweilige Transkriptionsrate gemessen wurde (Roeder et al., 1996).

Für die *in vivo* Situation geht man inzwischen davon aus, dass der Promotor eines Pol II-Gens durch einen weitgehend präformierten Pol II Komplex, das sogenannte RNA-Polymerase II Holoenzym, gebunden wird. Dieses Holoenzym wurde erstmals 1994 durch genetische Analysen bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erkannt. Inzwischen ist der Holoenzymkomplex auch in multizellulären Eukaryonten nachgewiesen (Myer und Young, 1998). Die genaue Zusammensetzung des Holoenzymkomplexes ist noch nicht hinreichend geklärt. In *S. cerevisiae* besteht die Minimalkomposition des Holoenzymkomplexes jedoch zweifellos aus der RNA-Polymerase II, den GTFs TFIIB, TFIIF und TFIIH, den SRB-Proteinen (SRB, Suppressor of RNA-Polymerase B) sowie den sogenannten SWI/SNF-Proteinen, die einen Einfluss auf die lokale Chromatinstruktur des Promotors ausüben, indem sie die repressive Chromatinstruktur durch die Bewegung der Nukleosomen auf der DNA aufheben (Workman und Kingston, 1998). Die SRBs sind eine Gruppe von 9 Proteinen, die direkt mit der CTD der RNA-Polymerase II interagieren (Hampsey, 1998, Myer und Young, 1998).

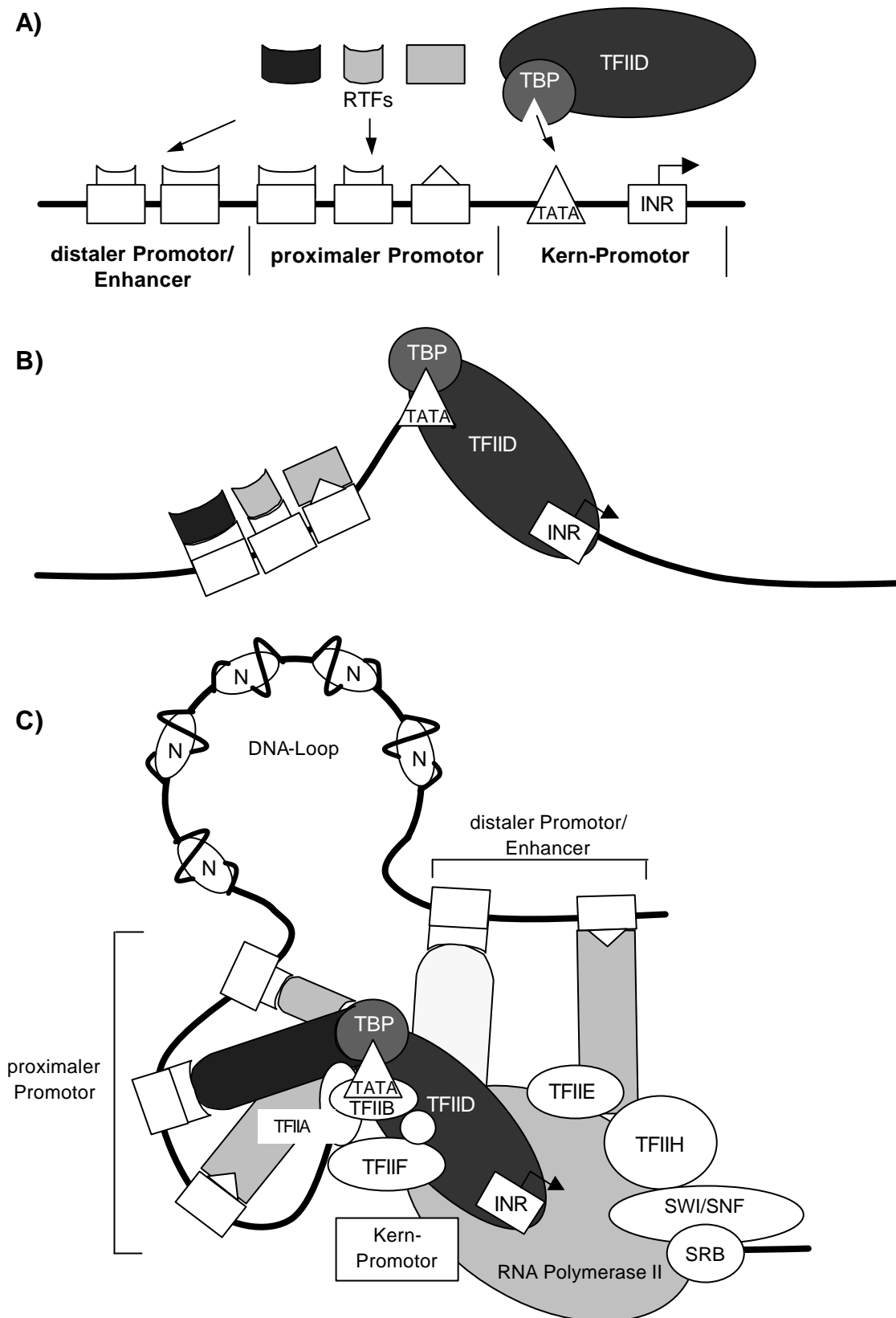


Abb. 4: Assemblierung des Transkriptionskomplexes

A) Schematische Darstellung der Kontrollregionen eines Promotors mit der TATA-Box (Dreieck) und dem Initiator (INR); der Transkriptionsstartpunkt ist als gewinkelter Pfeil dargestellt. B) Nach Bindung der TBP Untereinheit des TFIID-Komplexes an die TATA-Box erfolgt die Assemblierung des Transkriptionskomplexes. Die Bindung des TATA Box Binding Proteins (TBP) verursacht einen 90 ° Winkel an der DNA. C) Die Interaktion von RTFs mit den Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie kann entweder durch direkte Protein-Protein-Kontakte oder durch Überbrückung mittels sogenannter

Adaptorproteine erfolgen, wobei entfernt positionierte RTFs über eine Schleifenbildung der DNA an den basalen Promotor herangeführt werden. Die Chromatinstruktur kann durch positionierte Nukleosomen (N) wie auch durch Hilfsproteine (SWI/SNF, SRB) bestimmt werden. Die Gesamtheit des Initiationskomplexes zusammen mit den chromatinmodulierenden Faktoren wird als Transkriptosom bezeichnet.

Die transkriptionelle Aktivierung des Promotor-gebundenen Holoenzym erfolgt durch die regulatorischen Transkriptionsfaktoren (RTFs). Der gesamte Transkriptionskomplex mit regulatorischen Transkriptionsfaktoren und lokaler Chromatinstruktur wird als Transkriptosom bezeichnet (Abb. 3, C). Dieses Transkriptosom besteht bereits in *Saccharomyces cerevisiae* aus mehr als 50 Komponenten und besitzt ein Molekulargewicht von über 3 MDa.

2.4 Regulatorische Transkriptionsfaktoren

Die Initiation der Transkription wird reguliert durch die Bindung von sequenzspezifischen DNA-Bindeproteinen, den regulatorischen Transkriptionsfaktoren (RTF), die an den proximalen, distalen Promotor und Enhancer (Blackwood und Kadonaga, 1998) binden und sowohl mit den Komponenten von TFIID als auch des Holoenzym der RNA-Polymerase II interagieren. Zu der Gruppe der regulatorischen Transkriptionsfaktoren zählen Aktivatoren bzw. Repressoren sowie Enhancer und Silencer. Sie vermitteln ihre Fähigkeit zur Stimulation, indem sie direkt oder indirekt in Interaktion mit den GTFs der basalen Transkriptionsmaschinerie treten und so zur Aktivierung oder Repression des Initiationsereignisses beitragen. Die differentielle Genaktivität, d.h. das komplexe und spezifische Muster der genspezifischen Transkription bezüglich zeitlicher, räumlicher oder signalvermittelter Parameter, wird wesentlich durch die Aktivität der RTFs definiert.

In ihrem molekularen Aufbau weisen viele RTFs eine modulare Zusammensetzung einzelner Strukturdomänen auf, die gleichzeitig funktionelle Domänen repräsentieren. Die Funktionsdomänen erfüllen die Aufgaben der spezifischen DNA-Bindung, der Transkriptionsaktivierung respektive -reprimierung oder der spezifischen Interaktion mit anderen Proteinen.

2.4.1 Struktur motive der DNA-Bindungsdomänen

Für die hochaffine und hochspezifische Erkennung einzelner DNA-Sequenzelemente sind die sogenannten DNA-Bindungsdomänen der Transkriptionsfaktoren verantwortlich. Die DNA-Bindungsstellen weisen oft eine palindromische Sequenzsymmetrie auf. Dutzende von DNA-Bindungsmotiv-Klassen sind in höheren Eukaryonten beschrieben und einige von ihnen werden noch in Untergruppen unterteilt. Nachfolgend werden einige der wichtigsten bzw. am besten charakterisierten DNA-Bindungsmotive beschrieben. Hierzu

zählen das Zink-Finger-Motiv, Helix-Turn-Helix-Motiv, Helix-Loop-Helix-Motiv und der Leucin-Zipper.

Das Helix-Turn-Helix (HTH) Motiv der Homöodomäne

Dieses DNA-Bindungsmotiv wurde in Eukaryonten anfangs in einer Gruppe von Genen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (Ingham, 1985). Strukturell besteht dieses Motiv aus zwei α -Helices, die durch einen „Turn“ oder Umkehrschleife voneinander getrennt sind. Eine der α -Helices tritt über elektrostatische Wechselwirkungen mit den Basen der großen Furche der Ziel-DNA in Kontakt, weshalb sie auch als Erkennungshelix bezeichnet wird. Die zweite α -Helix liegt der ersten senkrecht gegenüber und stellt den Kontakt zu der DNA über unspezifische Wechselwirkungen her (Abb. 5, A); Pabo und Sauer, 1992). Der Winkel zwischen den beiden α -Helices beträgt ca. 120° , die Biegung wird von drei bis vier Aminosäuren gebildet. Dieses HTH-Strukturmotiv findet sich in einer Vielzahl eukaryontischer DNA-Bindungsproteine.

Helix-Loop-Helix (HLH) Motiv

Der interhelikale Bereich des HTH-Motivs kann auch in der verlängerten Form einer Schleife (Loop) existieren, so dass man dann von einem Helix-Loop-Helix-Motiv spricht (Abb. 5, D). Die HLH-Domäne besteht aus zwei α -Helices, die durch eine Schleife (Loop) verbunden sind. Über die amphipatischen Helices erfolgt die Dimerisierung des Proteins. Die DNA-Bindungsdomäne schließt sich N-terminal an eine der Helices an und besteht aus einem Cluster von basischen Aminosäuren, die mit dem Phosphatrückgrat der großen Furche der DNA in Wechselwirkung treten. Diese Transkriptionsfaktoren ähneln denen der Leucin-Zipper-Familie (siehe unten) insofern, als sie DNA als Homo- oder Heterodimere binden.

Das Zink-Finger-Motiv

Die Zink-Bindungsmotive enthalten Zn^{2+} -Ionen, die über vier Koordinationsstellen von Cystein- und/oder Histidin-Resten des Proteins komplexiert werden (Abb. 5, B). Entsprechend der Stöchiometrie der Komplexe können Zink-Finger des Typs Zink-Cys₂His₂, Zink-Cys₄ und Zink₂-Cys₆ unterschieden werden (Desjarlais und Berg, 1993). Der eukaryontische Transkriptionsfaktor SP1, der an seinem C-Terminus drei Zink-Finger enthält, stimuliert die Transkription durch eine selektive Bindung an eine GC-Box (Kadonaga und Tijan, 1986). Die DNA-bindende Domäne besteht aus einer Tandem-Wiederholung von dreißig Aminosäuren, deren Tertiärstruktur durch Koordination eines Zinkions mit je einem Paar Cystein- und Histidin-Resten aufrechterhalten wird. In dieser strukturellen Koordination finden sich eine antiparallele β -Haarnadelstruktur sowie ein α -helikaler Bereich. Letzterer ist essentiell für sequenzspezifische DNA-Erkennung an der

großen Furche. Bei der Familie der Steriodhormonrezeptoren wurde ein vergleichbares Motiv identifiziert (Desjarlais und Berg, 1993). Die C-terminale Bindungsdomäne dieses Motivs besteht aus zwei Zink-Fingern, bei denen das Zinkion über jeweils vier Cystein-Reste koordiniert ist.

Basischer Leucin-Zipper (bZIP)

Den bZIP-Transkriptionsfaktoren ist eine basische Bindungsdomäne gemeinsam. Das Protein bzw. die basische Bindungsdomäne wurde erstmals 1988 bei Eukaryonten charakterisiert. Die Bindungsdomäne enthält eine hochkonservierte Region von etwa 30 Aminosäuren, die einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren aufweist. Über die positiven, N-terminalen Ladungen findet der Kontakt zu den negativ geladenen Phosphatgruppen der großen Furche der DNA-Helix statt. Eine zweite, konservierte Domäne befindet sich weiter C-terminal gelegen, der Leucin-Zipper (Leucin-Reißverschluß, Abb. 5, C). In diesem 28 Aminosäure langen α -helikalen Abschnitt befindet sich charakteristischerweise an jeder siebten Position die Aminosäure Leucin. Durch die α -helikale Struktur befinden sich alle hydrophoben Leucin-Reste auf einer Seite und können so mit den amphipatischen Helices anderer Protein-Moleküle dieser Familie in Wechselwirkung treten (Nelson, 1995). Der Leucin-Zipper selbst ist an der DNA-Erkennung nicht beteiligt, er wird lediglich als Strukturprinzip zur Dimerisierung des Proteins benötigt. Die Dimerbildung ist Voraussetzung für die genaue Positionierung der basischen Domäne an der großen Furche der DNA. Erfolgt zusätzlich noch eine Dimerisierung mit verschiedenen Proteinen, so lässt sich das Spektrum der möglichen transkriptionellen Kontrolle erweitern. Unter anderem ist eine Heterodimerisierung für eine Regulation der biologischen Aktivität der bZIP-Proteine untereinander von Bedeutung. Beispielsweise wird der AP1-Komplex, der aus den zwei bZIP-Proteinen Jun und Fos (siehe Abschnitt 2.5.4) besteht, durch die Bildung von Heterodimeren antagonisiert (Rauscher et al., 1988).

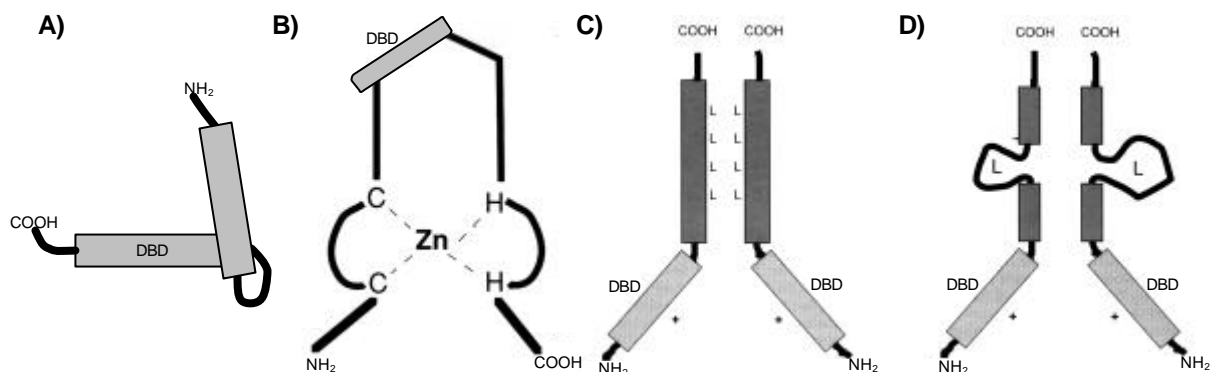


Abb. 5: Schematische Darstellung der DNA-Bindungsmotive von Transkriptionsfaktoren

DBD = DNA-Bindungsdomäne; A) Das Helix-Turn-Helix-Motiv ist eine Anordnung von zwei α -Helices, von denen eine die DNA bindet, während die andere Protein-Protein-Wechselwirkungen ausbildet; B) In Zink-Finger-Motiven wird ein zentrales Zinkion über Cystein- und Histidin-Aminosäureresten der Proteine

komplexiert; C) Der basische Leucin-Zipper bezeichnet einen α -helikalen Abschnitt in bestimmten dimeren DNA-Bindungs-Proteinen, in der sich mehrere Leucinreste auf einer Seite der Helix befinden und dadurch hydrophile Wechselwirkungen mit anderen Proteinen mit gleichem Motiv ermöglichen. Die sequenzspezifische DNA-Bindung erfolgt über die Nterminalen basischen Bereiche der Helices; D) Die Helix-Loop-Helix Proteine ähneln insofern den basischen Leucin-Zippern, dass die Dimerisierung der Proteine über die α -Helices und die DNA-Bindung durch jeweils eine basische Region vermittelt wird.

2.4.2 Transkriptionsaktivatoren

Aktivatoren sind regulatorische Transkriptionsfaktoren, die die Transkriptionsrate erhöhen. Bei der Aktivierung dirigieren diese Faktoren die basale Transkriptionsmaschinerie an den Kernpromotor. Aktivatoren, die an die CAAT- oder GC-Box binden, wirken konstitutiv, d.h. sie sind immer aktiv und benötigen keine externe Stimulierung. Des weiteren sind sie ubiquitär, d.h. in allen Zelltypen präsent. Andere Aktivatoren hingegen werden nur in einem bestimmten Zelltyp exprimiert. Hierzu gehören beispielsweise die GATA-Faktoren, die nur in Erythrozyten vorhanden sind und die Aktivierung von Genen regulieren, die für spezifische Proteine der roten Blutzellen (z.B. Hämoglobin) codieren. Andere Aktivatoren wiederum liegen in der Zelle in einer inaktiven Form vor und können die Transkription nicht stimulieren bis sie aktiviert werden. Die Aktivierung dieser Faktoren erfolgt über Phosphorylierung oder Dephosphorylierung sowie Konformationsänderungen des Proteins. Die Aktivierung wird im allgemeinen durch extrazelluläre Signale ausgelöst. Beispielsweise aktivieren Steroidhormone Aktivatoren der Transkription, in dem sie nach Eintritt in die Zelle an einen löslichen Rezeptor binden und eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins induzieren. Das Rezeptorprotein ist nun ein aktiver Transkriptionsfaktor. Transkriptionsfaktoren, die in der Zelle in einer inaktiven Vorstufe vorliegen und erst durch extra- oder intrazelluläre Signale in die aktive Form überführt werden, bezeichnet man als induzierbare Transkriptionsfaktoren.

Aktivatoren der Transkription tragen neben der DNA-Bindungsdomäne spezifische Regionen, die für die Aktivierung notwendig sind, sogenannte Aktivierungsdomänen (Triezenberg, 1995). Im Gegensatz zu den detaillierten Informationen über die Struktur von DNA-Bindungsdomänen sind die Strukturbeschaffenheiten der Aktivierungsdomänen nur unzureichend verstanden. Biochemische Studien zeigen, dass lokale Anhäufungen bestimmter Aminosäuren eine aktivierende Oberfläche ausbilden können. Beispiele für transaktivierende Domänen sind die glutaminreiche Domäne des Transkriptionsfaktors SP1 und die prolinreiche Domäne des Transkriptionsfaktors NF1, die aus 20 % Prolinresten besteht. Darüber hinaus stellt die Aktivierungsdomäne anderer Aktivatoren wie GAL4 der Hefe eine amphipatische α -Helix dar, bei der negativ geladene und unpolare Aminosäureseitenketten auf entgegengesetzten Seiten der Helix positioniert sind. Mit der Aktivierungsdomäne treten die Aktivatoren entweder direkt mit Komponenten der basalen

Transkriptionsmaschinerie oder indirekt über Wechselwirkungen mit sogenannten Coaktivatoren in Kontakt. Oft interagieren Aktivatoren über einzelne Aktivierungsdomänen mit einer Vielzahl verschiedener Proteine des basalen Transkriptionsapparates, woraus sich ein Modell der dynamischen Interaktionen ableitet (Triezenberg, 1995). Die Aktivierungsdomäne ist entweder ein Teil desselben Polypeptids oder sie ist auf einer separaten Untereinheit eines Multiproteinkomplexes lokalisiert. Letztere Organisation erhöht die regulatorische Vielfalt und kombinatorische Kontrolle. Viele, wenn nicht sogar alle, Aktivatoren haben multiple Aktivierungsdomänen und diese wirken additiv oder synergistisch auf das Aktivierungspotenzial (Emami und Carey, 1992).

2.4.2.1 Coaktivatoren

Zusätzlich zu den DNA-bindenden regulatorischen Transkriptionsfaktoren gibt es eine andere Klasse von RTFs, die als Coaktivatoren fungieren (Kaiser und Meisterernst, 1996). Sie nehmen Einfluss auf die Transkription, indem sie durch Protein-Protein-Wechselwirkungen indirekt Kontakte zwischen den RTFs und GTFs herstellen. Die überwiegende Zahl der Transkriptionsfaktoren ist nicht in der Lage die Transkriptionsaktivität des basalen Transkriptionsapparates ohne Coaktivatoren zu stimulieren. Coaktivatoren lassen sich in drei Klassen einteilen: den TAFs, die Bestandteil des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID sind, die Mediatoren, welche Bestandteile des Holoenzym RNA-Polymerase II sind und Wechselwirkungen mit der C-terminalen Domäne (CTD) eingehen (Björklund et al., 1999), und die allgemeinen Cofaktoren, die ihre Funktion im Kontext des gesamten basalen Transkriptionsapparates ausüben und nicht spezifisch mit einem der allgemeinen Transkriptionsfaktoren assoziiert sind. Unter den allgemeinen Cofaktoren finden sich Proteine, die sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die interagierenden Faktoren wirken. Die Verfügbarkeit der Coaktivatoren kann wie die der Transkriptionsaktivatoren gewebespezifisch über die Genexpression oder über Signalkaskaden gesteuert werden, so dass sich hier vielfache Möglichkeiten für eine gewebespezifische Transkriptionsaktivierung ergeben.

Die Wege, nach denen regulatorische Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren die Transkriptionsinitiation beeinflussen, sind noch unverstanden und weitgehend ein Gegenstand der Spekulation. Es werden zwei Hauptwege diskutiert, die möglicherweise kooperativ wirksam sind. Eine Konsequenz der Proteininteraktionen zwischen RTF und GTF könnten Konformationsänderungen des Präinitiationskomplexes sein, die nachfolgend zur Aktivierung enzymatischer Funktionen (Kinaseaktivitäten) des TFIID mit einhergehender CTD-Phosphorylierung führen. Die induzierte Phosphorylierung der CTD ist eine ursächliche Voraussetzung für den Schritt der Promotor-Clearance, d.h. die Affinität der Bindung der CTD an das TBP-Protein reduziert sich, als Folge verliert die

RNA Polymerase II Transkriptionsmaschinerie ihre Verankerung an den Promotor und kann die transkriptionelle Elongation beginnen. Dieses Modell der RTF-Wirkung impliziert, dass dies der limitierende Schritt der Initiation ist. In einem alternativen Modell wird den RTF die Funktion zugeschrieben, einen präformierten Komplex, das RNA Polymerase II Holoenzym, an die Startstelle der Transkription zu dirigieren.

2.4.2.2 Der Enhancer

Enhancer sind Verstärker-Elemente der Transkription, die ungeachtet ihrer Position und Orientierung relativ zur Startstelle der Transkription über große Entfernungen hinweg die Genexpression aktivieren (Kadonaga, 1998). Die Sequenzelemente des Enhancers können einige tausend Basenpaare stromaufwärts oder stromabwärts und in Introns lokalisiert sein. Anders als konventionelle Promotorelemente, die aus einzelnen, kurzen Sequenzmotiven bestehen, sind Enhancer wesentlich komplexer aufgebaut. Sie bestehen meistens aus mehreren Sequenzmotiven für Aktivatoren in unterschiedlicher Kopienzahl und Orientierungen zum Promotor, so dass ihre Größe zwischen 50 bis 150 Basenpaaren und in einigen Fällen auch mehr betragen kann. Diese sogenannten Module können wiederum multimerisieren, wodurch es zu einer weiteren Steigerung der Transkriptionsrate kommt. Die einzelnen Sequenzmotive kann man meist ohne große Auswirkungen auf die Transkriptionsrate entfernen. Erst die Entfernung des ganzen Enhancers führt zum Verlust der Transkriptionsaktivität, was darauf schließen lässt, dass es die Kombination und die Kooperativität der einzelnen Elemente ist, die die Funktion des Enhancers bestimmen. Wie Promotorelemente enthalten auch Enhancer verschiedene Bindestellen für spezifische Transkriptionsfaktoren. Einige von ihnen binden zellspezifische Transkriptionsfaktoren, die nur in einem bestimmten Gewebe exprimiert werden. In vielen Fällen wird die zellspezifische Expression eines Gens durch Enhancer bestimmt. Die Wirkung eines Enhancers wird durch dessen Wechselwirkung mit verschiedenen zellulären Transkriptionsfaktoren vermittelt (Latchman, 1995).

Gegenwärtig sind die spezifischen Eigenschaften, die es dem Enhancer oder distalen Kontrollelementen erlauben, von einer großen Entfernung zu wirken, nicht eindeutig bestimmt. Man nimmt an, dass der Enhancer mit Aktivatoren oder anderen sequenzspezifischen Proteinen interagiert, die an der Chromatin-Neugestaltung beteiligt sind. Diese Aktivatoren treten dann in Wechselwirkungen mit Proteinen die an den Kernpromotor oder regulatorischen Promotor gebunden sind. Die zwischen Enhancer und Kern-Promotor liegende DNA bildet eine Schleife aus und ermöglicht somit, dass die an das Verstärker-Element gebundenen Aktivatoren mit den allgemeinen Transkriptionsfaktoren des Pol II-Holoenzymkomplexes in Wechselwirkung treten. Erst

die Schleifenbildung ermöglicht die Interaktion über große Distanzen hinweg (siehe Abb. 4).

Die kooperative Bindung von Aktivatoren an den Enhancer und an den regulatorischen Promotor führt zu einer Kernproteinstruktur, die man als Enhanceosome bezeichnet (Thanos und Maniatis, 1995). Das Enhanceosome wird gebildet aus einem Netzwerk von Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen, die eine synergistische Aktivierung der Transkription bewirken.

2.4.3 Wirkungsmechanismen von Repressoren der Transkription

Neben der geregelten Aktivierung der Transkription stellt auch deren Repression ein wichtiger Kontrollmechanismus der Genaktivität dar. So kann durch ein komplexes Regelwerk von Aktivatoren und Repressoren eine fein abgestufte Transkriptionskontrolle erfolgen. Im Gegensatz zu Aktivatoren wirken Repressoren über eine Vielzahl von Mechanismen, um die Transkription durch die RNA Polymerase II zu inhibieren oder zu modulieren (Hanna-Rose und Hansen, 1996). Allgemein unterscheidet man zwischen direkter oder indirekter Repression. Unter der direkten Repression versteht man Mechanismen, bei denen der inhibitorische Transkriptionsfaktor die Ausbildung des Initiationskomplexes verhindert. Unter der indirekten Repression versteht man dagegen Mechanismen, bei denen der Repressor die Wirkung von Aktivatoren aufhebt oder umkehrt. Die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen von Repressoren sind in einer schematischen Darstellung in Abbildung 6 zusammengefasst.

Im Allgemeinen üben Aktivatoren ihre Funktion aus, indem sie zunächst mit ihren DNA-Bindungsdomänen an der DNA binden und dann über spezifische Aktivierungsdomänen in Wechselwirkung mit dem basalen Transkriptionskomplex treten und dabei die Transkription aktivieren (Abb. 6, A). Indirekt wirkende Repressoren heben die Wirkung von Aktivatoren auf, indem sie entweder ihre DNA-Bindung verhindern oder nach der DNA-Bindung die Wechselwirkung mit dem basalen Transkriptionskomplex stören. Vielfältige Mechanismen können zu einer indirekten Repression führen. Eine indirekte Repression tritt z.B. auf, wenn ein Repressorprotein mit einem Transkriptionsaktivator um die DNA-Bindungsstelle konkurriert. Das Ausmaß der Repression wird dann von den relativen Affinitäten der beiden Proteine zum DNA-Element sowie über das Konzentrationsverhältnis der beiden Proteine bestimmt (siehe Abb. 6, Wettbewerbsmodell C). Beispielsweise konkurrieren die GC-Box-bindenden Proteine SP3 (inhibitorisch) und SP1 (aktivierend) um die DNA-Bindestelle.

Eine weitere Möglichkeit der indirekten Repression ergibt sich über die heterotypische Dimerisierung. Werden Heterodimere zwischen zwei Transkriptionsfaktoren gebildet, von denen einer keine oder nur eine schwach bindende DNA-Bindungsdomäne aufweist, kann ein Transkriptionsaktivator in einem heterodimeren Komplex inaktiviert werden (Abb. 6, D). Da für eine starke Bindung an ein DNA-Element in der Regel beide Untereinheiten eines dimeren DNA-Bindungsproteins benötigt werden, ist eine Aktivierung durch diesen Typ von Heterodimeren nicht möglich. Beispielsweise führt die Dimerisierung der Aktivatoren der Helix-Loop-Helix Familie durch das Repressor Protein Id zur Inhibition der Transkription. Das Id-Protein besitzt eine Helix-Loop-Helix Domäne, aber keine weitere DNA-Bindedomäne. Es dimertisiert über die Helix-Loop-Helix-Domäne mit den Aktivatoren und verhindert so deren Bindung dieser an die DNA (Benezra et al., 1990).

Darüber hinaus kann die Dimerisierung zwischen zwei verschiedenen Aktivatoren zur Repression führen. Beispielsweise wird die Bindung des Glucocorticoidrezeptors an das Glucocorticoid Response Element (GRE) durch die Dimerisierung mit den schwächeren Transkriptionsaktivatoren Fos oder Jun verhindert.

Zudem können Repressoren transaktivierende Proteine inhibieren, die bereits an die DNA gebunden haben. Dies ist eine indirekte Repression, die als Quenching bezeichnet wird. Zwei Quenching-Mechanismen werden hier unterschieden, je nachdem ob der Repressor direkt an den DNA-gebundenen Aktivator bindet oder an eine benachbarte Bindestelle. Im ersten Fall bindet der Repressor an die Aktivierungsdomäne des Faktors, welche mit dem Initiationskomplex interagiert, und verhindert so die Aktivierung der Transkription. Dieser Mechanismus führt beispielsweise zu Sarkomen. Der Transkriptionsfaktor p53 aktiviert die Transkription von Genen, die das übermäßige Zellwachstum inhibieren. Er wirkt als Anti-Oncogen oder Tumor-Suppressor-Gen. In Sarkomen wird dieser Faktor durch das mdm2-Oncoprotein inaktiviert. Das mdm2 bindet an die Aktivierungsdomäne des DNA-gebundenen p53, was zu einem abnormalen Zellwachstum der Tumorzellen führt (Momand et al., 1992).

Binden Repressor und Aktivator an benachbarte, nicht überlappende DNA-Sequenzen, so verhindern direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen die Interaktion des Aktivators mit dem Initiationskomplex (Abb. 6, E). Im Gegensatz zur Dimerisierung wird hier die Transaktivierung, nicht jedoch die Bindung des Aktivators an die DNA unterbunden.

Ein letzte Möglichkeit der indirekten Repression ist die Bildung von spezifischen Protein-Protein-Komplexen zwischen dem Aktivator und dem Repressor. Dieser Komplex besitzt keine DNA-Affinität mehr. Eine Freisetzung des Repressors bewirkt dann die Aktivierung, wie im Fall von NF- κ B und dem inhibitorischen Protein I κ B, die im Abschnitt 2.5.3.2 näher beschrieben werden (Abb. 6, F).

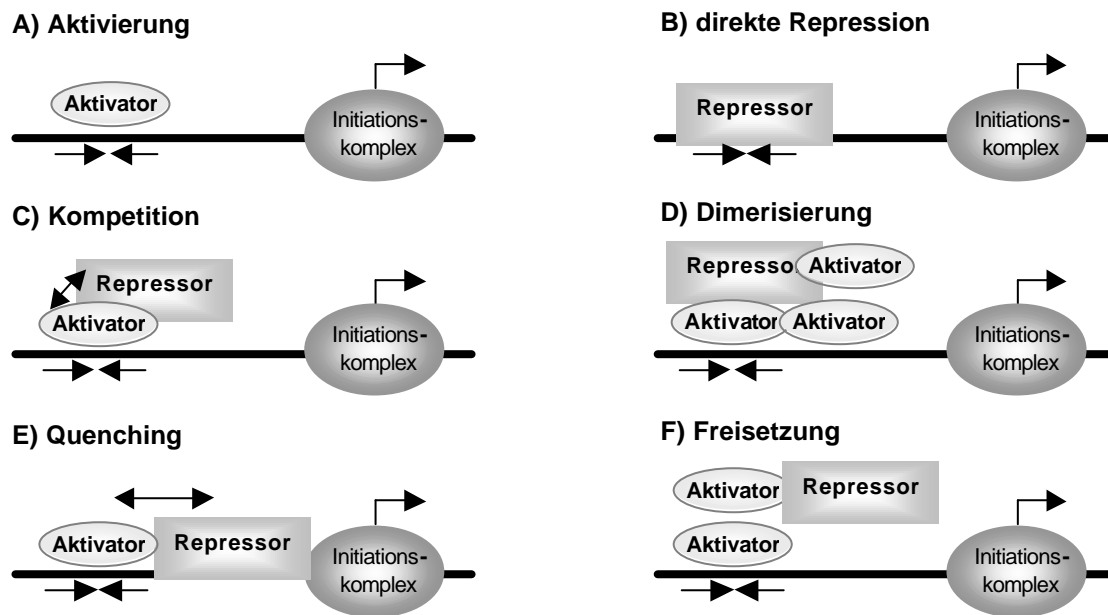


Abb. 6: Wirkungsmechanismen von Repressoren der Transkription

A) Ein Aktivator stimuliert nach Bindung an die DNA-Bindungsstelle die Initiation der Transkription; B) Direkte Repression des Initiationskomplex nach Bindung an die DNA; C) Aktivator- und Repressorbindestellen überlappen und kompetitieren um dieselbe DNA-Bindungsstelle; D) Der Repressor verdrängt den Aktivator aus einem Dimer, die Bindung an die DNA wird verhindert; E) Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen gebundenem Aktivator und Repressor beeinträchtigen den Kontakt zwischen Aktivator und Initiationskomplex, dieser Mechanismus wird auch als Aktivator-Maskierung bezeichnet; F) Der Repressor bildet einen Komplex mit dem Aktivator und verhindert die Bindung an die DNA.

Die direkt wirkenden Repressoren inhibieren die Transkriptionsinitiation durch Interaktion mit basalen Komponenten des Transkriptionskomplexes der RNA Polymerase II und senken deren Aktivität herab (siehe Abbildung 6, B).

Diese Faktoren reprimieren die Transkription entweder durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen des Promotors und anschließender Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem basalen Transkriptionskomplex oder durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem Initiationskomplex. Tritt der Repressor in einem frühen Stadium direkt mit den allgemeinen Transkriptionsfaktoren in Kontakt, kann er auch die Assoziation weiterer GTFs verhindern, die über Aktivatoren gebunden werden.

Die direkt wirkenden Repressoren haben wie die Aktivatoren eine modulare Struktur. Neben der DNA-Bindungsdomäne tragen sie eine Repressordomäne, welche mit Faktoren des basalen Transkriptionsapparates in Wechselwirkung tritt. Direkte Repressoren sind beispielsweise das bZIP-Protein E4BP4 und der Transkriptionsfaktor REST (siehe Abschnitt 2.5.1).

Bemerkenswert ist das Auftreten von Faktoren, die als Aktivatoren oder Repressoren der Transkription wirken. Ihre funktionelle Eigenschaft scheint vom Promotorkontext und der Distanz zum Promotor abzuhängen. Einer dieser Faktoren ist das Zinkfinger-Protein YY1,

das dieser ungewöhnlichen Eigenschaft seinen Namen Ying Yang verdankt. Darüber hinaus wirkt er als Initiator der Transkription (Ogbourne and Antalis, 1998). Der Transkriptionsfaktor Oct-2 wirkt ebenfalls als Aktivator oder Repressor der Transkription. Darüber hinaus existieren alternative Spleißvarianten des Transkriptionsfaktors Oct-2, wodurch verschiedene Kombinationen von Aktivierungs- und Repressordomänen erzeugt werden, die unterschiedliche Effekte auf die Genexpression haben. Eine Spleißvariante ist Oct-2.1. Dieser Faktor enthält eine N-terminale Repressordomäne und eine C-terminale Aktivierungsdomäne und aktiviert hauptsächlich die Transkription, da die Aktivierungsdomäne eine stärkere Aktivität besitzt. Hingegen haben die Spleißvarianten Oct-2.4 und Oct-2.5 nur eine N-terminale Repressordomäne. Diese Faktoren wirken daher als Repressoren der Transkription. Interessanterweise wird dieser Spleißvorgang in einer gewebespezifischen Art und Weise reguliert, so dass der aktivierende Oct-2.1 Faktor in B-Lymphozyten entsteht und die reprimierenden Oct-2.4 und Oct-2.5 Faktoren in neuronalen Zellen. Das alternative Spleißen von Transkriptionsfaktoren führt zur spezifischen Regulation der Transkription in verschiedenen Zelltypen oder nach einem bestimmten Stimulus.

Das Verhältnis dieser antagonistisch wirkenden Faktoren ist eine wesentliche Voraussetzung für die räumliche und zeitliche Expression einzelner Gene. Die Transkriptionsrate eines Gens wird somit über aktivierende und reprimierende Transkriptionsfaktoren feinreguliert.

2.4.3.1 Silencer

Als Silencing bezeichnet man den Vorgang, der die Aktivierung von Genen trotz der Anwesenheit von Transkriptionsaktivatoren verhindert.

Man nimmt an, das Silencer-Proteine an distale Kontrollregionen binden und die Heterochromatinstruktur stabilisieren. Eine Aktivierung des Gens durch Aktivatoren der Transkription ist dann nicht mehr möglich (Ogbourne und Antalis, 1998). Beispielsweise bewirken die Silencer-Faktoren SIR in *Saccharomyces cerevisiae* die Repression der Genloci der Paarungsgene HMLa und HML α . Einige dieser SIR-Proteine assoziieren mit den N-Termini der Histone H3 und H4 und deacetylieren das Kern-Histon (Grunstein, 1997). Der Mechanismus der Silencer-Aktivität ist in höher Eukaryonten noch wenig verstanden und man weiß noch nicht ob er dem in Hefe entspricht oder direkte Repressionsmechanismen wie Methylierung und/oder Histon-Deacetylierung die Ursachen der Transkriptionsinaktivierung sind.

2.4.4 Regulatorische Transkriptionsfaktoren bilden Module

Obwohl einige regulatorische Transkriptionsfaktoren für sich allein arbeiten können, funktionieren die meisten cis-wirksamen Kontrollregionen und Enhancer als ein Teil eines Komplexes, der aus mehreren Transkriptionsfaktoren besteht. Jeder einzelne davon besitzt eine unterschiedliche Funktion und keiner von ihnen kann allein die Funktion erfüllen. Diese nächst höhere Promotor-Organisation bezeichnet man als Promotor-Modul (Werner, 1999). Jedes Modul ist durch ein bestimmtes Repertoire an zwei oder mehreren Protein-Bindungsstellen charakterisiert, die sich in einem definierten Abstand zueinander befinden. Durch die Bindung verschiedener Aktivatoren und Repressoren wird das Gen entweder aktiviert, oder es bleibt inaktiv. Im Gegensatz zu isolierten Bindungsstellen erlauben Module synergistische oder antagonistische Effekte.

Promotor-Module vermitteln eine definierte Funktion in einem Promotor-Kontext. Das NF- κ B/IRF1 Modul vermittelt beispielsweise die Interferon- und Tumornekrosefaktor-Stimulierbarkeit der Transkription von β -Interferongen sowie verschiedener MHC/HLA-Gene der Klasse II. Dieses Modul trägt zwei Bindestellen, jeweils für den Transkriptionsfaktor NF- κ B und IRF1. Ist nur einer der beiden Transkriptionsfaktoren am Modul gebunden, wird die Transkription dieser Gene nicht induziert. Entscheidend für die Funktion ist die Reihenfolge der Elemente und der Abstand der DNA-Bindungsstellen in diesem Modul.

In einigen Fällen arbeiten zwei Regulatorproteine mit nur schwacher gegenseitiger Affinität zusammen, um an eine DNA-Sequenz zu binden, da keines der Proteine alleine an die DNA-Sequenz binden kann. Erst nach der DNA-Bindung kann das Protein-Dimer eine Oberflächenstruktur ausbilden, die von einem dritten Proteine erkannt wird; letzteres trägt eine Aktivator-domäne und stimuliert die Transkription. Dies Beispiel illustriert eine allgemeingültige Tatsache: Bestimmte Protein-Protein-Wechselwirkungen sind in Lösung für die Bildung eines Proteinkomplexes zu schwach. Erst nach Bindung an die DNA kann ein stabiler Proteinkomplex ausgebildet werden.

Ein einzelner Transkriptionsfaktor kann oft an mehr als nur einem Typ von Modul beteiligt sein. Deshalb sind eukaryontische Transkriptionsfaktoren notwendigerweise nicht nur Aktivatoren oder Repressoren, sie sind stattdessen regulatorische Einheiten, die zur Ausbildung von Komplexen benutzt werden, deren Funktion von der endgültigen Zusammensetzung aller einzelnen Komponenten abhängt.

Die Promotor-Module ermöglichen es also, dass ein bestimmter Transkriptionsfaktor in verschiedenen Zellen unterschiedliche Zielgene zellspezifisch reguliert. Der Vorteil einer komplexen Genregulation durch Ausbildung von Faktorkombination in Modulen ist, dass dadurch die Anzahl der benötigten Regulatoren reduziert wird.

2.5 Transkriptionelle Regulation im Nervensystem

Das Nervensystem ist das mit Abstand komplexeste Organsystem des menschlichen Körpers, das nach anatomischen und funktionellen Gesichtspunkten in Zentralnervensystem, bestehend aus Gehirn und Rückenmark, und dem peripheren Nervensystem, das Nervenimpulse von der Peripherie zum ZNS und umgekehrt leitet, eingeteilt wird. Eine herausragende Eigenschaft des Nervensystems ist der enorm hohe Verknüpfungsgrad der Neuronen. So besteht das menschliche Gehirn aus ca. 1 Billionen Neuronen, von denen jedes durchschnittlich zehntausend interneuronale Verbindungen besitzt. Die außergewöhnliche Komplexität des Nervensystems beruht aber nicht nur auf der milliardenfachen Verschaltung zwischen, sondern auch auf der hohen funktionellen Variabilität von Nervenzellen. Der individuelle Aufbau des rezeptiven Apparates der Dendriten und der Axone zeigt deutlich, dass im Nervensystem die Funktion durch die Struktur bestimmt wird (Herdegen 1996).

Nervenzellen können in bestimmtem Umfang ihre elektrophysiologische Erregungsbildung, ihre synaptische Verschaltung, ihre Struktur und ihre Proteinsynthese verändern. Diese Rückkopplung zwischen extraneuronalen Ereignissen und morphologisch-funktionellen Veränderungen einer Nervenzelle wird als neuronale Plastizität verstanden. Das Gleichgewicht zwischen Stabilität und Plastizität bestimmt die strukturelle und funktionelle Integrität des Nervensystems.

Im Nervensystem spielt die Aktivierung der Genexpression durch neuronale Aktivität in der Entwicklung und bei Regenerations- und Lernprozessen eine besonders wichtige Rolle. Es konnte auch gezeigt werden, dass die mRNA-Konzentration für Neuropeptide durch starke neuronale Aktivität (z.B. epileptischer Anfall im Rattenmodell) messbar beeinflusst werden kann. Neuronale Aktivität verändert somit die Muster der Genexpression in unserem Gehirn.

Belegt wird dies durch die außerordentlich große Zahl verschiedener Proteine in Nervenzellen. Im Nervensystem werden ungefähr 30 - 50 Prozent aller in einer typischen menschlichen Zelle vorhandenen Gene exprimiert. Korrelierend zur großen Zahl exprimierter Gene, codieren im Nervensystem schätzungsweise 1 bis 10 Prozent aller Gene für Transkriptionsfaktoren. Diese Zahlen verdeutlichen, welche Bedeutung die Transkriptionskontrolle und die koordinierte spezifische Genexpression für die intakte Funktion des Nervensystems besitzen (Herdegen, 1996).

Das Verständnis der molekularen Mechanismen, auf denen die Regulation der eukaryontischen Genexpression beruht, hat sich in den letzten Jahren wesentlich erweitert. Besonders die Untersuchung der Regulationsmechanismen der gewebespezifischen Genexpression hat große Fortschritte gemacht. Für viele Zelltypen konnten DNA-Sequenzelemente und entsprechende Transkriptionsfaktoren, die eine zelltyp- und

entwicklungsspezifische Expression von Genen vermitteln, identifiziert werden. Zum Beispiel bei Zellen des Muskels, der Leber, des Immunsystems und der Hypophyse.

Während in vielen nichtneuronalen Geweben cis-wirkende, zellspezifische DNA-Sequenz-Elemente in den ersten 200 Nukleotiden stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle vorkommen, zeigten Analysen an neuronal exprimierten Genen, dass die meisten dieser Promotoren keine neuronalen Kontrollelemente in der proximalen Promotorregion aufwiesen (beispielsweise Gene für Neurofilamente, Synapsin II, Synaptophysin, den Dopamin D2-Rezeptor, GAP-43, Nestin, α -Internexin und den NGF-Rezeptor). Die Promotorstruktur neuronal exprimierter Gene scheint von derer gewebespezifisch exprimierter Gene anderer Organe abzuweichen. Promotoranalysen dieser neuronspezifischen Gene zeigen zwei entscheidende Mechanismen der Transkriptionskontrolle, die zu einer neuronalen Expression der Gene führen. Zum einen werden sie über Silencer bzw. Repressoren reguliert, die eine Expression in allen Zelltypen außerhalb des Nervensystems unterdrücken und zum anderen werden sie über Stimulus-induzierte Signalkaskaden gezielt im Nervensystem aktiviert. Beide Mechanismen werden in den folgenden Abschnitten anhand ausgewählter Beispiele vorgestellt.

2.5.1 Der RE-1 Silencer Transkriptionsfaktor

Der RE-1 Silencing Transkriptionsfaktor (REST), der auch als Neuron-Restrictive-Silencer-Factor (NRSF) bezeichnet wird, ist ein starker Repressor, der die Transkription neuronaler Gene mit funktioneller REST-Bindestelle in nichtneuronalen Zellen reprimiert (Schoenherr und Anderson, 1995). Dieser Transkriptionsfaktor verhindert somit die Expression neuronaler Gene außerhalb des Nervensystems.

Die reprimierende Funktion des REST-Proteins wurde erstmals durch Untersuchungen an dem neuronalen Gen Synapsin I festgestellt. Die Synapsine sind eine Familie von neuronspezifischen membranständigen Phosphoproteinen der synaptischen Vesikel, die sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem exprimiert werden. Im Gegensatz zu anderen synaptischen Vesikelproteinen wie Synaptobrevin, Synaptophysin und Synaptotagmin sind keine homologen Proteine außerhalb des Nervensystems bekannt. Synapsin I verbindet synaptische Vesikel mit dem Cytoskelett und reguliert über die Phosphorylierung bestimmter Proteine die Neurotransmitterfreisetzung. Weiterhin ist es an Prozessen der kurzfristigen synaptischen Plastizität beteiligt. Untersuchungen der Promotoren des Synapsin I-Gens aus Ratte und Mensch zeigten, dass die proximale Promotorregion für die neuronspezifische Expression ausreichend ist (Thiel et al., 1999). In dieser Region befindet sich an Position -231 eine REST-Bindestelle, deren Deletion zur kompletten Aufhebung der neuronspezifischen Expression führt (Thiel et al., 1998). Diese

und weitere Deletionsstudien an REST-Bindestellen der neuronalen Gene SCG10 (superior cervical ganglia-10 growth associated protein) und dem Typ II Natriumkanal aus Ratte zeigten, dass ein negativer Regulationsmechanismus unter Verwendung eines Repressorproteins für die neuronspezifische Transkription verantwortlich ist. Auch in undifferenzierten neuronalen Vorläuferzellen wird REST stark exprimiert und verhindert hier die vorzeitige Expression des neuronalen Phänotyps während der Neurogenese.

Mittlerweile sind zahlreiche neuronale Gene mit funktionellen Neuron-Restrictive-Silencer-Elementen bekannt (Tab. 2.1). Diese Gene codieren für Proteine, die für die Bildung und den Erhalt des neuronalen Phänotyps wesentlich sind. Hierzu gehören neuronale Rezeptoren, Neurotransmitter, Adhäsionsmoleküle, Proteine der synaptischen Vesikel, Transkriptionsfaktoren und Kanalproteine.

Tab. 2.1: Neuronale Gene mit REST-Bindestellen

AMPA, α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure; NMDA, N-methyl-D-aspartat; GABA, γ -Aminobuttersäure; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; CRF, Corticotropin-releasing factor; SCG10, Superior cervical ganglia-10 growth associated protein; NgCAM, Neuron-glia cell adhesion molecule

Rezeptoren	Position des NRSE
nikotinischer Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ (r)	5'-UTR
nikotinischer Acetylcholinrezeptor $\beta 2$ (h)	5'-UTR
muskarinischer Acetylcholinrezeptor m4 (r)	distaler Promotor
Glycinrezeptor $\alpha 2$ (h)	5'-UTR
AMPA Rezeptor (m)	distaler Promotor
NMDA Rezeptor NR2C (m)	5'-UTR
GABA-A Rezeptor δ (r)	Intron
Adhäsionsproteine	
L1 (h)	Intron
NgCAM (r)	Intron
Ionenkanal	
Typ II Natriumkanal (r)	distaler Promotor
Neuropeptide	
BDNF (r)	Intron
CRF (h)	Intron
Proenkephalin (r)	Intron
SCG10 (r)	distaler Promotor
Transkriptionsfaktoren	
HES-3 (m)	Exon (codierend)
P-Lim (m)	5'-UTR
synaptische Vesikelproteine	
Synapsin I (h)	proximaler Promotor
Synaptophysin (r)	Intron

Die Konsensussequenz der REST-Bindestelle wurde durch Sequenzabgleiche von 25 neuronalen Genen ermittelt. Das Neuron-Restrictive-Silencer-Element (NRSE) oder Repressor-Element (RE-1) umfasst 21 bp mit der gemeinsamen Sequenz 5'-NNCAGCACCNNGCACAGNNNC-3' (N = A, C, G oder T) (Schoenherr et al., 1996). REST-Bindestellen mit mehr als 6 Abweichungen von der Consensussequenz

(beispielsweise in den Promotoren der $\alpha 7$ -Untereinheit des nicotinischen Acetylcholinrezeptors, der $\alpha 3$ -Untereinheit der Natrium/Kalium-ATPase sowie der Dopamin β -Hydroxylase) werden nicht von REST gebunden (Schoenherr et al., 1996).

Interessanterweise zeigen neuere Untersuchungen das REST im geringeren Umfang auch in differenzierten Neuronen exprimiert wird und eine regulatorische Funktion der Transkription in diesen Zellen ausübt (Bessis et al., 1997 und Palm et al., 1998). Unter Verwendung des Promotors der $\beta 2$ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors, der die REST-Bindestelle in der 5'-nichttranslatierten Region trägt, zeigten transiente Transfektionen neuronaler Zelllinien, das REST sowohl als Repressor als auch Aktivator der Transkription wirkt (Bessis et al., 1997). Die jeweilige Funktion ist abhängig von der Lage der REST-Bindestelle im Promotor und des Zelltyps. Ist die REST-Bindestelle stromabwärts in der 5'-nichttranslatierten Region oder weniger als 50 bp stromaufwärts von der TATA-Box positioniert, wird die Transkription in neuronalen Zellen aktiviert. Ist sie hingegen mehr als 50 bp stromaufwärts von der TATA-Box lokalisiert, wird die Transkription reprimiert. Die Lage der REST-Bindestellen in den Promotoren neuronaler Gene ist in Tabelle 2.1 angegeben. Im Gegensatz dazu wirkt REST in nichtneuronalen Zellen ungeachtet der Position immer als Repressor.

Strukturell gehört der Transkriptionsfaktor REST zur Klasse der Gli-Krüppel-Zinkfinger Proteinen (Thiel et al., 1998). Das REST-Protein enthält eine DNA-Bindungsdomäne, zwei Repressordomänen und eine Wiederholungseinheit mit bisher unbekannter Funktion. Die DNA-Bindungsdomäne ist am N-Terminus innerhalb einer Anhäufung von 8 Zinkfinger-motiven (Abb. 7) lokalisiert. Die Repressordomänen befinden sich am N- und C-Terminus des Proteins. In der C-terminalen Repressordomäne ist zusätzlich ein Zinkfinger-motiv enthalten. Die beiden Repressordomänen unterscheiden sich deutlich in ihrer Primärstruktur und Aktivität, denn die C-terminale Repressordomäne ist weniger aktiv als die N-terminale.

Die allgemeine Struktur der DNA-Bindungsdomäne der Krüppel Zinkfingerproteine ist ein Zinkfinger mit zwei Cystein- und Histidinresten, die um ein Zinkion koordiniert sind. Die eine Hälfte des Zinkfingers besteht aus zwei antiparallelen β -Haarnadelstrukturen und die zweite Hälfte aus einer α -Helix. Hydrophobe Kontakte zwischen diesen Strukturen werden über konservierte Phenylalanin- und Leucin-Resten gebildet. Die α -Helix bindet die DNA an der großen Furche. Zur Gruppe der Krüppel-Zinkfingerproteine gehören auch die Transkriptionsfaktoren Krüppel und YY1. Diesen ist REST nicht nur strukturell, sondern auch funktionell ähnlich, denn sie wirken ebenfalls als Repressoren und Aktivatoren der Transkription (Shi et al., 1997).

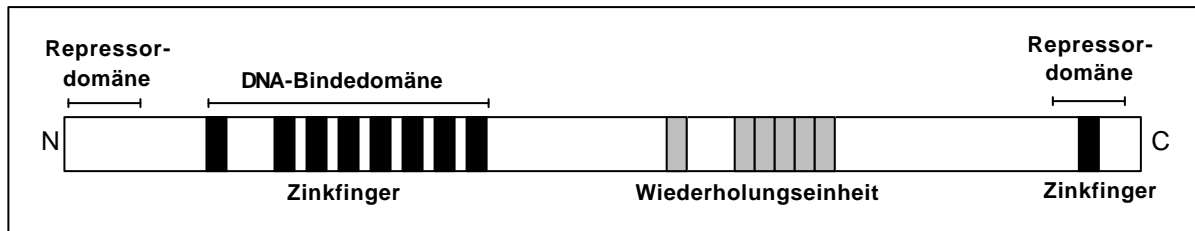


Abb. 7: Die modulare Struktur des Transkriptionsfaktors REST

Ein Cluster aus acht Zinkfingern an der N-terminalen Region fungiert als DNA-Bindedomäne. Die Repressordomänen befinden sich am N- und C-Terminus. Zusätzlich enthält REST eine Wiederholungseinheit, dessen Funktion bisher nicht bekannt ist.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Modell der Transkriptionskontrolle durch REST. In Neuronen, wo REST in niedrigen Konzentrationen exprimiert wird, aktiviert er die Transkription neuronaler Gene, wenn die Bindestelle in der 5'-UTR oder maximal 50 bp stromaufwärts der TATA-Box lokalisiert ist (nikotinischen Acetylcholinrezeptors $\beta 2$ und $\alpha 7$, Glycinrezeptor $\alpha 2$, P-Lim und NMDA-Rezeptor, siehe Tab. 2.1), wohingegen Promotoren mit distaler Bindestelle nicht reguliert werden (Typ II Natriumkanal, SCG10, Synapsin I etc. siehe Tab. 2.1). In nicht-neuronalen Zellen wie auch in neuronalen Vorläuferzellen, wo REST in hohen Konzentrationen exprimiert wird, reprimiert er die Transkription ungeachtet des Promotorkontexts (Bessis et al., 1997; Ogbourne und Antalıs, 1998). In Abbildung 8 ist die Regulation durch REST schematisch dargestellt.

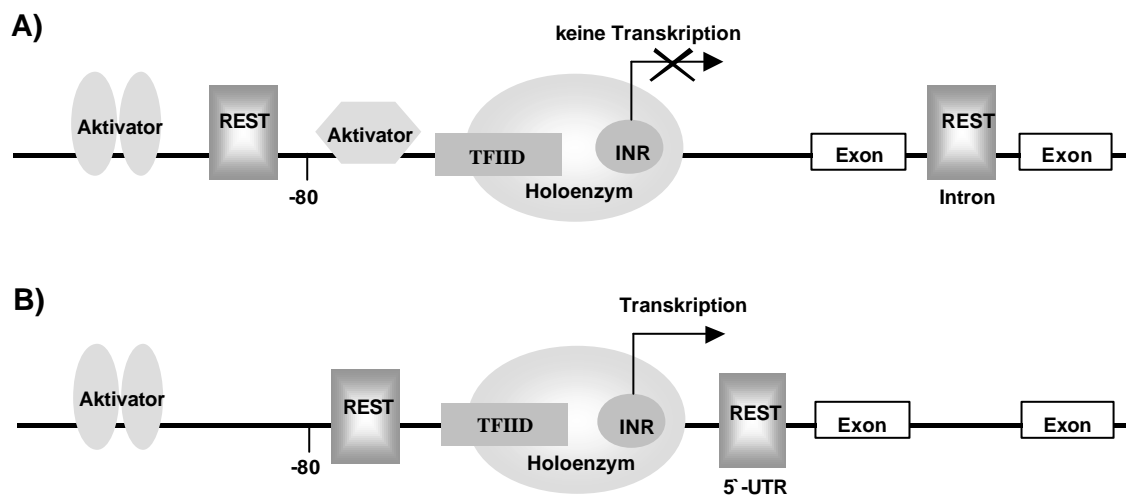


Abb. 8: Regulation der neuronalen Transkription durch REST

Schematische Darstellung eines Promotors mit dem basalen Transkriptionsapparat einschließlich RNA Polymerase II Holoenzym, TFIID Proteinkomplex und dem Initiator der Transkription (Inr). In nicht-neuronalen Zellen und neuronalen Vorläuferzellen wird der Transkriptionsfaktor REST hoch exprimiert und reprimiert die Transkription neuronaler Gene in diesen Zellen. Wohingegen REST in neuronalen Zellen in geringerer Konzentration vorliegt und je nach Lage der REST-Bindestelle die Transkription reprimiert oder aktiviert. A) Befindet sich die REST-Bindestelle mehr als 50 bp stromaufwärts der TATA-Box oder stromabwärts in Introns wird die Transkription reprimiert. B) Ist die REST-Bindestelle maximal 50 bp von der TATA-Box oder stromabwärts in der 5'-nichttranslatierten Region lokalisiert, aktiviert RE-1 die Transkription neuronaler Gene.

2.5.2 Stimulus-Transkriptions-Kopplung im Nervensystem

Eine Voraussetzung für Zellwachstum und Differenzierung ist, dass jede Zelle in der Lage sein muss, die Signale von anderen Zellen und der Umgebung zu empfangen, zu interpretieren und darauf zu antworten. Auf die Signale ihrer Umgebung reagieren Zellen mit der Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden, die extrazelluläre Signale in die jeweiligen zellulären Kompartimente weiterleiten. Auf diese Weise können die Zellen ihre Proteinzusammensetzung und somit ihre Funktionalität den sich ständig ändernden Anforderungen der extrazellulären Umgebung anpassen.

Auch Neuronen reagieren auf extrazelluläre Reize mit einer Veränderung der Proteinsynthese und damit mit kurzfristig oder längerdauernden funktionellen und strukturellen Änderungen. So können sie in bestimmtem Umfang ihre elektrophysiologische Erregungsbildung, ihre synaptische Verschaltung, ihre Struktur und Proteinsynthese verändern. Diese Rückkopplung zwischen extraneuronalen Ereignissen und morphologisch-funktionellen Veränderungen einer Nervenzelle wird als neuronale Plastizität bezeichnet. So ist das Aussprossen und synaptische Remodellieren in Abhängigkeit von der präsynaptischen Aktivität ein wesentlicher physiologischer Mechanismus der Gedächtnisbildung und der Reifung des Gehirns oder der postnatalen Ausbildung des Dendritenbaumes von Motoneuronen. Die Plastizität vollzieht sich jedoch in einem phylogenetisch fest vorgegebenen Rahmen, der auf dem präzise festgelegten Bauplan des Nervensystems beruht. Störungen des Gleichgewichts zwischen Stabilität und Plastizität können das Ergebnis oder die Folge angeborener oder erworbener neuronaler Fehlfunktionen sein (Herdegen 1996).

Die Stimulation der Neuronen aktiviert zwei verschiedene Mechanismen durch die sie Informationen prozessieren und übertragen. Zum einen die elektrophysiologische Aktivität, die zu einer sofortigen Übertragung der Information führt und zum anderen die länger wirkende „Second Messenger Signalkaskade“, die zur Bildung von Transkriptionsfaktoren führt. Dadurch wird das Transkriptionsmuster der Neuronen verändert und funktionelle sowie strukturelle Änderungen der Zellen hervorgerufen. Die Transkriptionsfaktoren aktivieren beispielsweise Gene, deren Proteine Neurotransmitter-Rezeptoren, Ionenkanäle und Cytoskelettstrukturen bilden, oder die für die Neurotransmitter-Synthese und -Regeneration benötigt werden.

Extrazelluläre Signalmoleküle wie Hormone und Neurotransmitter (humorale oder synaptische Stimulation) interagieren mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Diese Rezeptoren sind mit einem membranassoziierten Signaltransduktionskomplex gekoppelt, der das empfangene Signal amplifiziert und die Synthese von Second Messenger und Transkriptionsfaktoren aktiviert. Auf diese Weise wird das Genexpressionsmuster und die

Funktion von Proteinen verändert. Die Signale lösen also kurz- und langfristige Veränderungen in der Zelle aus. Die zeitlich schnelle Beeinflussung von Stoffwechselprozessen über Signalmoleküle sind Kurzzeiteffekte, sie kommen ohne Einbeziehung der Genexpression aus (Modifikation vorhandener Substrate), wohingegen durch Veränderungen von Genaktivitäten Langzeiteffekte ausgelöst werden. Langfristige zelluläre Antworten sind transkriptions- und translationsabhängig.

Konstitutiv exprimierte Transkriptionsfaktoren und induzierbare Transkriptionsfaktoren bestimmen, welche Gene als spezifische Reizantwort exprimiert werden. Dieser als Stimulus-Transkriptions-Kopplung bezeichnete Prozess umfasst jene Zwischenschritte, die von der neuronalen Erregung zur Gentranskription führen und dabei die Information des Reizes in einen von der DNA gespeicherten Molekülcode umwandeln. Die Stimulus-Transkriptions-Kaskade lässt sich vereinfacht in sechs Ebenen einteilen, die verstärkend oder hemmend interagieren können (Abb. 9):

1. rezeptive Strukturen in der Membran, 2. intermediäre Proteine (z.B. G-Proteine, Adenylat-Zyklase), 3. Second Messenger (z.B. cAMP, Ca^{2+}), 4. davon abhängige Enzyme wie Kinasen, Phosphatasen oder Proteasen \Rightarrow kurzfristige Zellantwort, 5. konstitutive Transkriptionsfaktoren (z.B. CREB, SRF), 6. induzierbare Transkriptionsfaktoren (z.B. Fos und Jun), 6. Gentranskription von Zielgenen der induzierbaren Transkriptionsfaktoren \Rightarrow langfristige Zellantwort.

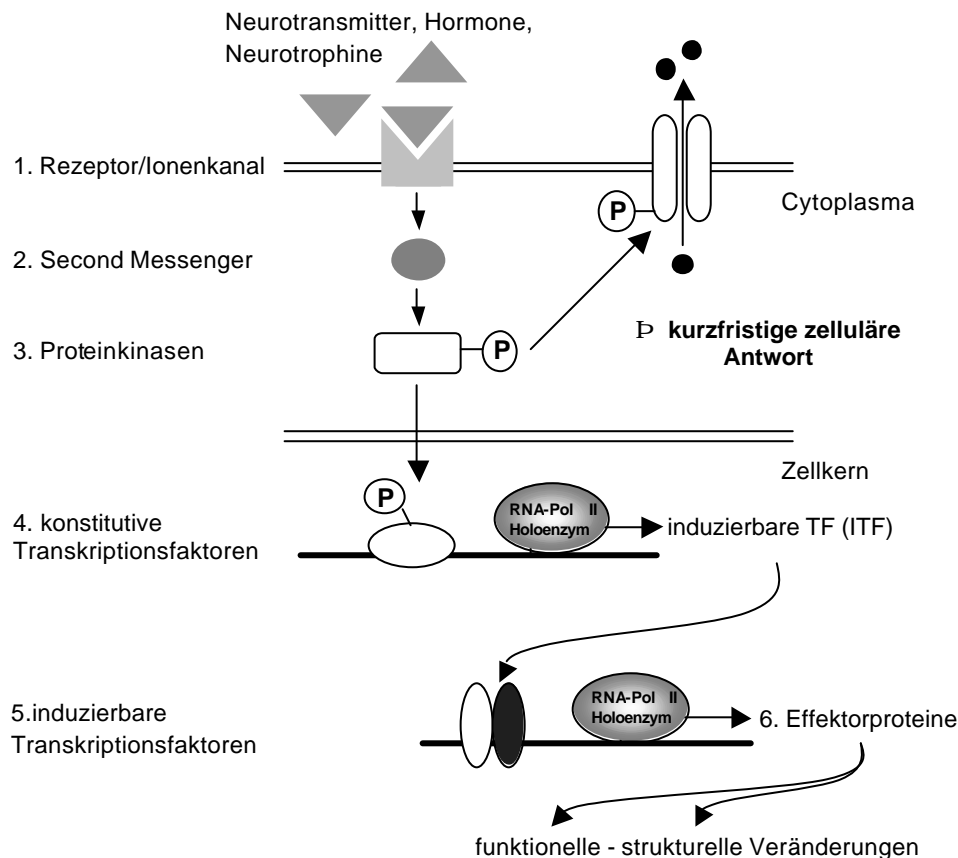


Abb. 9: In der Hierarchie der Signal-Transkriptions-Kopplung werden extraneuronale Signale (z.B. transsynaptische oder humorale Stimulation) in Aktivierung von Second Messengern, Enzymen (Kinasen, Phosphatasen) und Transkriptionsfaktoren sowie schließlich in die Expression von Effektorproteinen umgesetzt. Konstitutive Transkriptionsfaktoren leiten nach Phosphorylierung die Expression induzierbarer Gene ein, diese können ebenfalls für Transkriptionsfaktoren codieren, den ITFs (induzierbare Transkriptionsfaktoren). Kurzfristige zelluläre Antworten kommen ohne Einbeziehung der Genexpression aus (Modifikation vorhandener Substrate), wohingegen langfristige Antworten transkriptions- und translationsabhängig sind.

Konstitutive Transkriptionsfaktoren befinden sich ständig in inaktiver Form im Cytoplasma oder Zellkern, werden schnell nach einem Reiz von Kinasen der Signaltransduktionskaskaden durch Phosphorylierung aktiviert und bewirken den sofortigen Beginn der Genexpression. Der Zeitraum zwischen neuronaler Stimulation und der Expression der konstitutiven Transkriptionsfaktoren beträgt Sekunden. Konstitutive Transkriptionsfaktoren wiederum aktivieren oder reprimieren die Induktion von Genen, die für induzierbare Transkriptionsfaktoren (iTfFs) codieren. Des weiteren können sie aktivierende oder reprimierende Heterodimere mit iTfFs bilden. Die bedeutendsten konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktoren des Nervensystems sind das *cAMP response element binding protein* (CREB) und der *Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B). CREB ist der wichtigste Mediator der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses und weiterhin moduliert CREB die Synchronisation des zirkadianen Rhythmus, die synaptische Potenzierung sowie das Suchtverhalten. Zielgene von CREB sind neben den Genen für die

Proteine Enkephalin, VIP (Vasoaktives Intestinales Peptid), Somatostatin oder Tyrosinhydroxylase vor allem Gene, die für Transkriptionsfaktoren codieren. Hierzu gehören die Transkriptionsfaktoren c-Fos und Egr-2.

Die Transkription von induzierbaren Transkriptionsfaktoren wird also von bereits vorhandenen (konstitutiv exprimierten) Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Als Prototypen induzierbarer Transkriptionsfaktoren gelten die Mitglieder der AP-1 (activator protein-1)-Familien Fos und Jun. c-Fos ist ein Mediator der synaptisch-regulierten Genexpression und c-Jun von überwiegend degenerativen-regenerativen und immunologischen Signalen. Die iTFs verstärken, modulieren und spezifizieren die Gentranskription. Sie werden rasch exprimiert, daher auch die Klassifikation als immediate early genes (IEGs). Sie sind bereits 30 Minuten nach einem adäquaten Reiz als Protein nachweisbar. Die iTFs nehmen über die Kontrolle ihrer Zielgene Einfluss auf das Zellgeschehen und bestimmen die langanhaltenden Änderungen der Zelle.

Die Stimulus-Transkription-Kopplung führt sowohl zu einer Verstärkung als auch zu einer Spezifität der Genexpression. Es wird geschätzt, dass die Signale von einer Stufe auf die nächste um den Faktor 10 verstärkt werden, da ein Enzym zehn Substratmoleküle phosphorylieren kann. Für ein in vier Ebenen gegliedertes System lässt sich daher ein Verstärkungsfaktor von $10^3 = 1000$ berechnen. Die Amplifikation erhöht auch die Trennschärfe zwischen zwei gleichzeitig, aber mit unterschiedlicher Affinität aktivierten Signalkaskaden.

In den folgenden Abschnitten werden die bedeutensten konstitutiven Transkriptionsfaktoren NF- κ B und CREB sowie die induzierbaren Transkriptionsfaktoren der Mitglieder der AP-1 Familien Fos und Jun des Nervensystems vorgestellt.

2.5.3 Stimulus-induzierte Aktivierung konstitutiver Transkriptionsfaktoren im Nervensystem

2.5.3.1 Der Transkriptionsfaktor CREB

Einer der bedeutensten konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktoren des Nervensystems ist das *cyclische AMP response element binding protein* (CREB). CREB gehört zur Klasse von Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren mit basischer Region (bZIP Transkriptionsfaktoren, siehe Abschnitt 2.4.1), die als CREB-Familie bezeichnet wird. Die Mitglieder der CREB-Familie binden an ein gemeinsames DNA-Sequenzmotiv, das sogenannte *cAMP response element* (CRE). Die Konsensus-DNA-Sequenz des CREs besteht aus dem 8 bp

Palindrom 5'-TGACGTCA-3'. Die Variationsmöglichkeiten der CRE-Bindungsproteine wird enorm erweitert durch die Fähigkeit über den Leucin-Zipper Homodimere und Heterodimere mit Mitgliedern der eigenen Familie sowie der AP-1 Familie (siehe Abschnitt 2.5.4) und C/EBP-Familie (die ebenfalls zur bZIP-Klasse gehören) zu bilden. Hinzu kommen die HLH-Transkriptionsfaktoren der myc-Familie, die ebenfalls einen Leucin-Zipper aufweisen. Daraus ergibt sich eine kombinatorische Vielfalt in der Regulation der Gentranskription (Herdegen und Leah, 1998).

Die Dimerisierung über den Leucin-Zipper ist für die DNA-Bindung notwendig. Erst dann bindet der Faktor über die basische Region an die große Furche der DNA und aktiviert über eine Glutamin-reiche Aktivierungsdomäne die Transkription der Zielgene. CREB ist das erste charakterisierte CRE-Bindungsprotein der CREB-Familie, das als Aktivator der Transkription wirkt. Mittlerweile wurden weitere Mitglieder der CREB-Familie identifiziert: Der ATF-1 (*Activating Transcription Factor 1*) und der CREM (*cAMP Response Element Modulator*). Die Zahl der Familienmitglieder wird zusätzlich erweitert, indem einige Gene verschiedene Isoformen durch alternatives Spleißen hervorbringen. Beispielsweise generiert das CREB-Gen drei Isoformen α , β und γ . Bemerkenswerterweise codiert das CREM-Gen sowohl für Aktivatoren als auch Repressoren. CREB, CREM τ und ATF-1 vermitteln eine transkriptionelle Aktivierung, wohingegen die alternativen Spleißformen CREM α , β und γ sowie ICER (inducible cAMP early repressor) und E4BP4 als Antagonisten der cyclischen AMP-vermittelten Transkription wirken (Herdegen und Leah, 1998).

Obwohl CREB außer im Gehirn auch in anderen Organen wie Milz, Herz, Thymus, Magen und Niere exprimiert wird, ist er einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren des Nervensystems. CREB wird konstitutiv exprimiert, d.h. seine Expression ist unabhängig von einem bestimmten Stimulus. Er liegt jedoch nach der Expression in inaktiver Form im Zellkern vor. Aktiviert wird CREB von Proteinkinasen durch Phosphorylierung, die ihrerseits nach einem bestimmten extrazellulären Stimulus über verschiedene Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden und in den Zellkern translozieren. Phosphoryliertes CREB bindet nach der Dimerisierung an Promotoren, die das regulatorische DNA-Element CRE tragen und aktiviert deren Transkription.

In Neuronen wird CREB über unterschiedliche Proteinkinasen phosphoryliert. Hierzu gehören hauptsächlich die Proteinkinase A (PKA, cAMP-abhängige Kinase), die Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase (CaMK) und die Ras-abhängige Proteinkinase. CREB ist somit der nukleäre Endpunkt von Signalkaskaden, die durch die extrazellulären Signalmoleküle Hormone, Neurotransmitter, Membrandepolarisation bzw. Ca^{2+} -Einstrom und Wachstumsfaktoren aktiviert werden (Herdegen und Leah, 1998).

Die beiden bedeutensten Signaltransduktionswege der Neuronen, die zur Aktivierung von CREB über die Proteinkinase A und die Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase führen, werden im Folgenden beschrieben.

2.5.3.1.1 Regulation der CREB-Aktivität durch Hormone und Neurotransmitter

Hormone und Neurotransmitter vermitteln ihre Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Zelloberfläche (siehe Abbildung 10). Diese Rezeptoren sind mit einem membranassoziierten Signaltransduktionskomplex gekoppelt, der das empfangene Signal amplifiziert und zu der Synthese des sekundären Botenstoffs cyclisches AMP (cAMP) führt. Die Synthese von cAMP beruht auf der spezifischen Aktivierung des Enzyms Adenylatzyklase über das G-Protein. Das gebildete cAMP diffundiert in das Cytoplasma und bindet dort an die regulatorischen Untereinheiten der bis zu diesem Zeitpunkt inaktiven cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). Dieses Enzym überträgt die endständige Phosphatgruppe von ATP auf spezifische Serin- oder Threoninreste ihrer Substrate. In der inaktiven Form bildet die PKA einen Komplex aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten, welche cAMP binden. Die Bindung von cAMP ändert die Konformation der regulatorischen Untereinheiten, die den Komplex verlassen. Die freigesetzten katalytischen Untereinheiten sind nun aktiv und nach anschließender Translokation in den Zellkern wird der Serinrest in Position 133 (Ser-133) des Transkriptionsfaktors CREB phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung wird der konstitutiv exprimierte Transkriptionsfaktor CREB von der inaktiven in die aktive Form überführt. Dieser bindet nun nach Dimerisierung an das cAMP-response Element (CRE), das in den Promotorregionen cAMP-induzierbarer Gene lokalisiert ist (Abb. 10). Phosphorylierung von CREB durch PKA erhöht das Transaktivierungspotenzial dieses Faktors. Somit ist also eine geschlossene Signalkaskade aufgezeigt, in der ein extrazelluläres Signal (z.B. das Hormon Adrenalin) nach Bindung an den spezifischen Rezeptor (β -adrenerger Rezeptor) zur indirekten Aktivierung zweier Enzyme (Adenylat-Zyklase und PKA) und nachfolgender Stimulation eines Transkriptionsfaktors CREB führt. In dieser Signalkaskade wird der Eintritt des Signals in den Zellkern mittels der nukleären Translokation einer Kinase realisiert. Die Substrate von PKA sind von Zelltyp zu Zelltyp verschieden. Hieraus wird ersichtlich, warum cAMP in Abhängigkeit von der jeweiligen Zielzelle vielfältige Reaktionen auslöst (Lamprecht, 1999 und Alberts et al., 1995).

2.5.3.1.2 Regulation der CREB-Aktivität durch Ca^{2+}

CREB kann auch durch Ca^{2+} /Calmodulin-Kinasen aktiviert werden (siehe Abb. 10). Calciumionen wirken als ubiquitäre intrazelluläre Botenstoffe. Die Ca^{2+} -Konzentration ist im Cytosol niedrig ($< 10^{-7}$ M). Wenn allerdings ein Signal vorübergehend die Ca^{2+} -Kanäle in der Membran öffnet, strömen Ca^{2+} in das Cytosol ein und führen zu einer drastischen Erhöhung der lokalen Ca^{2+} -Konzentration. Dadurch werden Ca^{2+} -abhängige Proteine in der Zelle aktiviert (Lamprecht, 1999).

Die Kontaktpunkte, an denen Neuronen ihre Signale auf andere Neuronen, Muskel- oder Drüsenzellen weitergeben, bezeichnet man als Synapsen. Man unterscheidet elektrische und chemische Synapsen. Elektrische Synapsen, die auf schnelle Signalübertragung spezialisiert sind, sind am prä- und postsynaptischen Teil der Synapse über Cytoplasmabrücken miteinander verbunden (gap junctions). Bei den chemischen Synapsen bewirkt das ankommende Aktionspotenzial eine Neurotransmitterfreisetzung an der präsynaptischen Membran. Der Neurotransmitter diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an spezifische Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Chemische Synapsen verwenden einen Ca^{2+} -abhängigen Signalübertragungsweg zur Neurotransmitterausschüttung an der präsynaptischen Membran. Wird die Membran der Nervenendigungen infolge eines Aktionspotenzials depolarisiert, strömt Ca^{2+} über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aus der extrazellulären Flüssigkeit in eine Nervenendigung ein bzw. wird aus Zellspeichern freigesetzt, was wiederum die Ausschüttung von Neurotransmittern zur Folge. Damit die Ca^{2+} -Konzentration einen bestimmten Schwellenwert im Cytosol nicht überschreitet, wird es von Calcium-bindenden Proteinen wie Calmodulin gebunden, die wiederum Ca^{2+} -regulierte Prozesse vermitteln. Die Aktivierung von Calmodulin durch Ca^{2+} erfolgt analog zur Aktivierung der PKA durch cAMP, nur dass Ca^{2+} /Calmodulin selbst keine Enzymaktivität besitzt. Ca^{2+} /Calmodulin wird erst dadurch aktiv, dass es an Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (CaMK) bindet. Einige dieser Kinasen, wie die CaM-Kinase-II oder CaMK-IV in den Synapsen von Nervenzellen, translozieren daraufhin in den Zellkern und aktivieren über Phosphorylierung an Ser-133 den Transkriptionsfaktor CREB (Abb. 10; Lamprecht, 1999).

Desaktiviert wird CREB durch Dephosphorylierung am Serinrest 133 über die Proteinphosphatase 1 (PP-1) und wahrscheinlich auch PP-2A und PP-2B. Die Aktivität von CREB hängt somit zu jedem Zeitpunkt vom jeweiligen Gleichgewicht zwischen den Kinasen, die es phosphorylieren, und den Phosphatasen, die es dephosphorylieren, ab.

Im weiteren Verlauf bestimmen Kofaktoren, wie das *CREB Binding Protein* (CBP) und die Dimerisierungspartner, welcher Promotor aktiviert wird. Der Coaktivator CBP assoziiert mit CREB nach der Proteinkinase A-Phosphorylierung des Ser-133. Durch die Bindung

mit CBP kommt es zur Interaktion mit den basalen Transkriptionsfaktoren TFIID und TFIIB und somit zur Transkription cAMP-induzierbaren Gene (Abb. 10).

Die Dimerisierung von CREB mit CREM α , β , γ und ICER inhibiert die Gentranskription. CREM α , β und γ besitzen keine Transaktivierungsdomänen, so dass nach der Heterodimerisierung mit CREB dessen Aktivierungsdomäne maskiert ist und die Interaktion mit dem basalen Transkriptionskomplex unterbleibt (Herdegen und Leah, 1998).

Die Vielzahl der bekannten CRE-Bindungsproteine reflektieren das breite Spektrum der Prozesse, an denen diese Proteine beteiligt sind. Es wird jedoch auch deutlich, dass die Konzentration und die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren sehr exakt reguliert werden muss, um eine zielgerichtete Aktivierung der Transkription nach Stimulation zu ermöglichen.

Neben der Proteinkinase A und den Ca²⁺/Calmodulin-Kinasen können auch Nervenwachstumsfaktor- und BDNF-induzierbare Kinasen (Abb. 10) das CREB am Serinrest 133 phosphorylieren und damit überadditive oder integrative Effekte der CREB-gesteuerten Transkription bewirken. Des weiteren interagieren auch die Ca²⁺-/Calmodulin- und PKA-Signaltransduktionswege miteinander, denn der Ca²⁺/Calmodulin-Komplex kann auch die cAMP bildende Adenylatzyklase stimulieren, wodurch die PKA aktiviert wird. CREB bildet somit ein Konvergenzpunkt für unterschiedliche Signaltransduktionswege des Nervensystems.

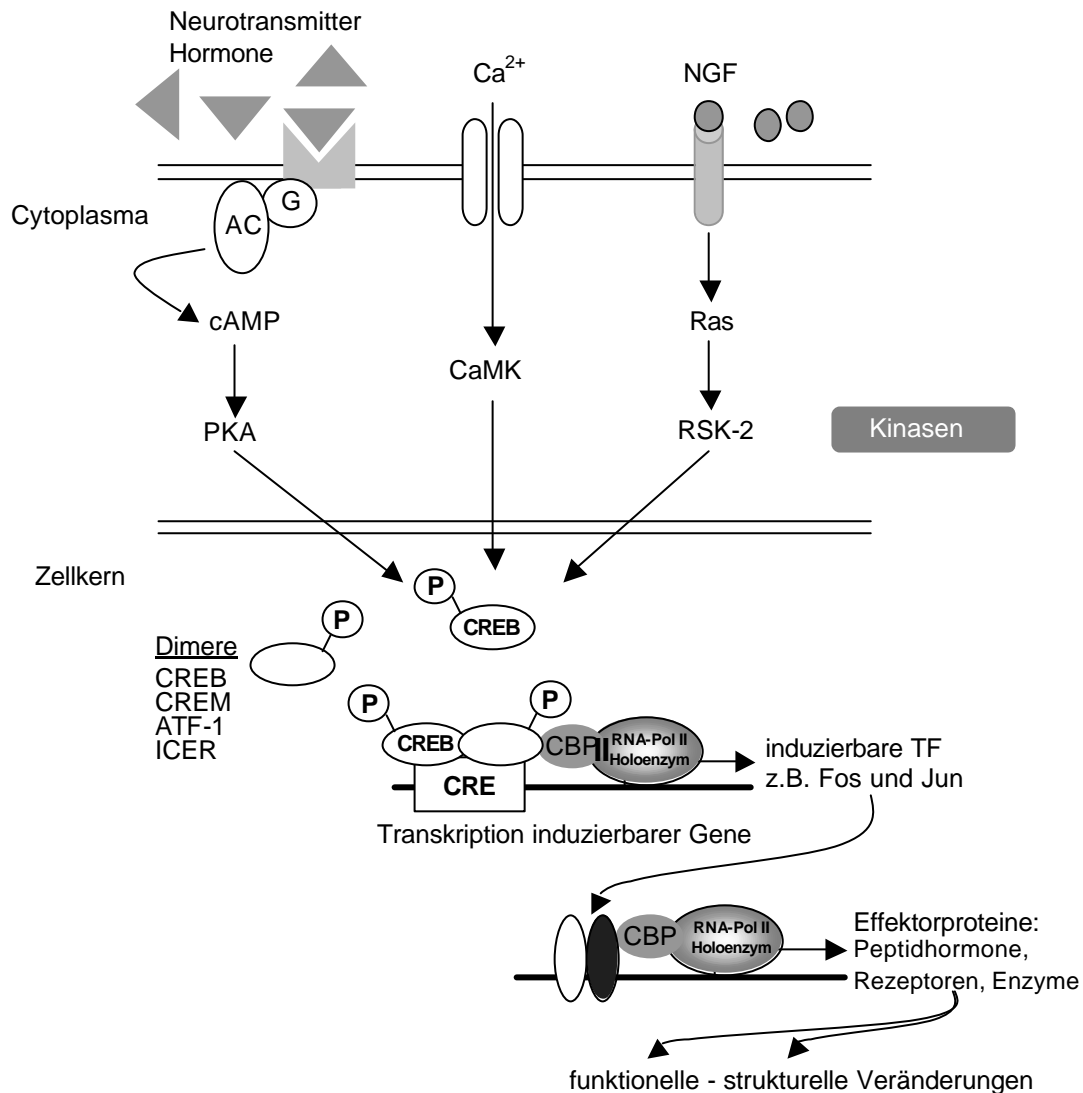


Abb. 10: Regulation des Transkriptionsfaktors CREB im Nervensystem

CREB kann durch die ribosomale S6-Proteinkinase (RSK-2), Ca^{2+} /Calmodulin-Kinasen (CaMK) und Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert werden und damit die Wirkung durch Wachstumsfaktoren (z.B. Nerve Growth Factor, NGF), Calcium und Neurotransmittern sowie Hormonen in Veränderungen der Genexpression umsetzen. Im ersten Schritt der cAMP-abhängigen Signaltransduktionskaskade wird die Dissoziation der α -Untereinheit eines Rezeptor-assoziierten G-Proteins (G) von den β , γ -Untereinheiten aus der cytoplasmatischen Seite der Membran ausgelöst. Die α -Untereinheit aktiviert das Enzym Adenylatcyclase (AC), das cAMP synthetisiert. cAMP bindet an die beiden regulatorischen Untereinheiten des PKA-Holoenzym (PKA), wodurch die katalytischen Untereinheiten freigesetzt werden. Diese translozieren in den Kern der Zelle und phosphorylieren das CRE-Bindungsprotein CREB. Phosphoryliertes CREB stimuliert im Zusammenspiel mit dem Coaktivator CBP die Transkription cAMP-induzierbarer Gene. Phosphorylierung (P) am Serinrest 133 oder Serinrest 142 von CREB durch Kinasen und Dephosphorylierung durch Phosphatasen erhöhen oder vermindern die Transaktivierung und DNA-Bindung. Weiterhin bestimmen Cofaktoren (wie CBP = CREB binding protein) und die Dimerisierungspartner, welcher Promotor aktiviert wird. So wird die Transkription von CREB durch Dimerisierung mit CREM und ICER gehemmt.

2.5.3.1.3 Die Rolle von CREB bei der Gedächtnisbildung

Herausragende Bedeutung für die neurobiologische Forschung besitzt CREB als transkriptioneller Mediator der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses.

Der second messenger cAMP und das CRE-Bindungsprotein CREB sind im ZNS entscheidend an der Induktion von langfristigen zellulären Veränderungen beteiligt, die den Prozessen des Lernens und des Gedächtnisses zugrunde liegen. Das Lernen bezeichnet die Aufnahme von Informationen, wohingegen das Gedächtnis als die Fähigkeit zum Wiederabruf definiert wird.

Lern- und Gedächtnisvorgänge beruhen auf der Interaktion von spezifischen Nervenzellen, die zu einer dauerhaften Veränderung der Synapsen an bestimmten neuronalen Schaltkreisen führen. Dabei werden im Bereich der Synapsen interzelluläre Kontakte aufgebaut, verfestigt oder auch gelöst. Dieser Prozess wird als synaptische Plastizität bezeichnet. Die strukturellen Veränderungen an den Synapsen werden dabei von biochemischen Modifikationen begleitet, zu denen unter anderem eine lokale Proteinneusynthese in den Dendriten der Nervenzellen gehört. Ein solcher, für eine effektive synaptische Plastizität essentieller Mechanismus ermöglicht der aktivierten Nervenzelle eine schnelle Produktion relevanter Proteine direkt „vor Ort“. Man nimmt an, dass Erinnerungen in Mustern synaptischer Stärke codiert sind. Darunter versteht man den Einfluss, den eine Nervenzelle auf eine andere ausübt, wenn eine Veränderung des Zellmembranpotenzials an der Synapse ankommt. Ein Mechanismus für die langfristigen Modifizierungen der synaptischen Stärke ist die Langzeitpotenzierung (long term potentiation, LTP). Unter LTP versteht man den Effekt, dass eine kurze, hochfrequente Reizung von Nervenzellen zu einer anhaltenden Steigerung der Neurotransmission und zu einer synaptischen Verstärkung von Nervenbahnen führen kann. Das Phänomen der LTP dient als Modellsystem zur Untersuchung derjenigen Prozesse, auf denen das Gedächtnis beruht (Malenka, 1994). Die Speicherung von Informationen im Gehirn, kann in zwei zeitlich aufeinanderfolgende Phasen unterteilt werden. In der ersten Phase, dem Kurzzeitgedächtnis, wird die Information zunächst transient, für Minuten bis Stunden, maximal Tage gespeichert und dann in der zweiten Phase, dem Langzeitgedächtnis, in eine für Wochen, Jahre oder lebenslange anhaltende Form umgewandelt. Die Umwandlung der temporären in eine permanente Informationsspeicherung wird als Konsolidierung bezeichnet. Die Konsolidierung kann durch Inhibitoren der Transkription und Translation verhindert werden. Die Genexpression wird deshalb für die Langzeitspeicherung von Informationen als notwendig angesehen. Der Mechanismus der Kurzzeitspeicherung beruht auf der temporären Veränderung der Transmitterausschüttung an den beteiligten Synapsen. Auf molekularer Ebene werden nach Erregung der Nervenzelle über Rezeptor-gebundene G-Proteine die cAMP-Second-Messenger-Kaskade und somit die Proteinkinase A aktiviert, die verschiedene an der elektrischen oder chemischen Weiterleitung von

Signalen beteiligten Proteine durch Phosphorylierung modifiziert. Kalium-Kanäle werden durch die Phosphorylierung verschlossen, und damit die Aktionspotenziale verlängert. Dadurch kommt es zum stärkeren Ca^{2+} -Eintritt über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und somit zu einer erhöhten Transmitterausschüttung. Diese Modifikationen werden als molekulare Komponenten des Kurzzeitgedächtnisses beschrieben, da sie nur eine kurze Zeitspanne von Sekunden bis Minuten vorhanden sind (Shors und Matzel, 1997).

Im Gegensatz zum Kurzzeitgedächtnis, das auf der Modifizierung bereits vorhandener Proteine beruht, erfordern das Langzeitgedächtnis und LTP, die *de novo* Synthese von mRNA und Proteinen. Dadurch erst können die notwendigen Umgestaltungen (Auf- und Abbau) von Synapsen durchgeführt werden.

Die molekularen Mechanismen des Langzeitgedächtnisses beruhen auf einer erhöhten cAMP-Konzentration in den Neuronen. Hierdurch kommt es zu einer verminderten Reassoziaton der katalytischen und regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A sowie zu einem proteolytischen Abbau der regulatorischen Untereinheiten und damit zu einer längerfristigen Erhöhung der PKA-Aktivität, so dass vermehrt CREB aktiviert wird.

CREB seinerseits aktiviert Effektorgene, die zum Auswachsen neuer Nervenzellfortsätze, zur Bildung neuer Synapsen und zur Umgestaltung der bestehenden Synapsen beitragen. Zielgene von CREB sind:

- Enkephalin (Neuropeptid)
- VIP (Vasoaktives Intestinales Peptid, Neuropeptid)
- Somatostatin
(Neuropeptid, inhibitorischer Neurotransmitter ausgeschüttet von Interneuronen)
- Tyrosinhydroxylase
(Katecholamin-synthetisierendes Enzym; zu den Katecholaminen gehören die Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin)
- Dynorphin (Neuropeptid)
- Synapsin I (Neurotransmitter-freisetzendes Enzym)

Schließlich aktiviert CREB die Bildung von Transkriptionsfaktoren, die zur Expression weiterer Gene führen. Hierzu gehören die Transkriptionsfaktoren c-Fos, Pit-1 und Egr-2 (Herdegen und Leah, 1998).

Die cAMP-abhängige Genexpression ist ein molekularer Schalter für die Konsolidierung der Informationsspeicherung. Dies konnte in den letzten Jahren sowohl durch elektrophysiologische Untersuchungen als auch bei einer CREB-Gen defizienten transgenen Maus gezeigt werden. Die Mäuse, in denen das CREB-Gen inaktiviert worden

war, wiesen Defizite in Leistungen auf, die ein funktionierendes Langzeitgedächtnis erforderten. Sie konnten jedoch noch Leistungen erbringen, die auf dem Kurzzeitgedächtnis beruhten (Ogasawara, 1999). Diese Funktion ist evolutionär konserviert, da sich vergleichbare Wirkungen von CREB bei der Meeresschnecke *Aplysia californica* und bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* sowie bei Ratte und Maus finden. Dies unterstreicht die Bedeutung der CREB-regulierten Transkription für den Prozess der Konsolidierung der Informationsspeicherung.

2.5.3.2 Die NF- κ B/Rel-Familie von Transkriptionsfaktoren

Die Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie werden ubiquitär exprimiert und regulieren die Expression von Genen der Entzündungsreaktionen, der Immunantwort und der Zellteilung (Baeuerle und Baltimore, 1996). Im Zentralnervensystem haben diese jedoch eine einzigartige Rolle, denn in Neuronen und Gliazellen regulieren sie zusätzlich zu den erwähnten Prozessen die neuronale Entwicklung, die synaptische Plastizität und Prozesse, die zum Erhalt der Gehirnfunktion (besonders nach Verletzungen und Neurodegenerationen) beitragen (O'Neill und Kaltschmidt, 1997; Mattson und Camandola, 2001). NF- κ B-Transkriptionsfaktoren werden daher als wichtigste regulatorische Faktoren des Zentralnervensystems für die neuronale und gliäre Zellfunktion betrachtet.

Der *Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B) wurde 1986 im Labor von David Baltimore als ein Regulator der Expression des Gens für die kappa leichte Kette (κ L) des Immunglobulins in murinen B-Lymphozyten entdeckt (Sen und Baltimore, 1986). NF- κ B wird konstitutiv exprimiert, d.h. seine Synthese muss nicht aktiviert werden. Man kann zwei Formen von NF- κ B unterscheiden: eine inaktive, im Cytoplasma lokalisierte Form und eine aktivierte Form, die sich im Zellkern befindet. In Antikörper-produzierenden B-Zellen sowie aktivierten T-Zellen und Makrophagen ist NF- κ B konstitutiv aktiviert. Dagegen liegt er in den meisten Zelltypen in der inaktiven, cytoplasmatischen Form vor und ist komplexiert mit dem inhibitorischen Protein I κ B (Baeuerle und Baltimore, 1996; Whiteside et al., 1997).

2.5.3.2.1 Struktur der Mitglieder der NF- κ B/I κ B Familie

Die einzelnen NF- κ B Transkriptionsfaktoren setzen sich aus verschiedenen Homo- oder Heterodimeren der Rel/NF- κ B-Familienmitglieder zusammen, die alle unterschiedliche biologische Eigenschaften aufweisen. Die bisher identifizierten Mitglieder bei Säugern sind RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50 und sein Vorläuferprotein p105) und NF- κ B2 (p52 und sein Vorläuferprotein p100). Ihre Struktur ist in Abbildung 11 schematisch

dargestellt. Strukturelle Gemeinsamkeit dieser Rel/NF- κ B-Familienmitglieder ist eine hochkonservierte aminoterminal 300 Aminosäurereste umfassende Domäne, die als Rel-Homologiedomäne (RHR, Rel Homology Region) bezeichnet wird. Diese Region vermittelt die DNA-Bindung, die Dimerisierung und die Interaktion mit den inhibitorischen Proteinen der I κ B-Familie. Weiterhin ist in dieser RHR eine Translokationssequenz für den Nukleus (NLS, Nuclear Localization Signal) enthalten. Eine Sonderstellung innerhalb der Familie nehmen die Mitglieder NF- κ B1 (p105/p50) und NF- κ B2 (p100/p52) ein. Während c-Rel, RelA und RelB nicht prozessiert werden und zusätzlich am C-Terminus eine Transaktivierungsdomäne tragen, werden die Untereinheiten NF- κ B1 und NF- κ B2 als Vorläuferproteine p105 und p100 synthetisiert, die über Proteolyse in ihre aktiven Formen p50 und p52 übergehen (Karin und Verma, 2000). Aufgrund der fehlenden Transaktivierungsdomäne in den Polypeptiden p50 und p52 können Homodimere und p50/p52 Heterodimere auch als Repressoren der Transkription wirken (Franzoso et al., 1992). Zusätzlich enthalten sie eine Ankyrinregion (s.u.), weshalb sie auch zur Familie der I κ B-Proteine gezählt werden.

Zur Familie der inhibitorischen I κ B-Faktoren, die im Cytoplasma der Zelle im Komplex mit NF- κ B Transkriptionsfaktoren vorliegen, gehören die Proteine I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ und Bcl-3 sowie die Vorläuferproteine von NF- κ B1 (p105) und NF- κ B2 (p100). Sie alle enthalten sechs oder sieben Kopien einer 33 Aminosäurereste umfassenden Sequenz, das Ankyrin-Wiederholungs-Motiv (siehe Abb. 11), das die Interaktion mit der Rel-Homologiedomäne vermittelt und das Zellkern-Translokationssignals NLS der NF- κ B Untereinheiten maskiert. I κ B α , I κ B β und I κ B γ besitzen am N-Terminus ein Sequenzmotiv, das für den induzierten Abbau dieser Proteine notwendig ist (Ghosh et al., 1999).

Durch die unterschiedliche Homo- und Heterodimerisierung der Untereinheiten werden eine Vielzahl von NF- κ B Transkriptionsfaktoren gebildet, die wiederum durch verschiedene Signalübertragungswege und Abbau der inhibitorischen Komponente I κ B, aktiviert werden.

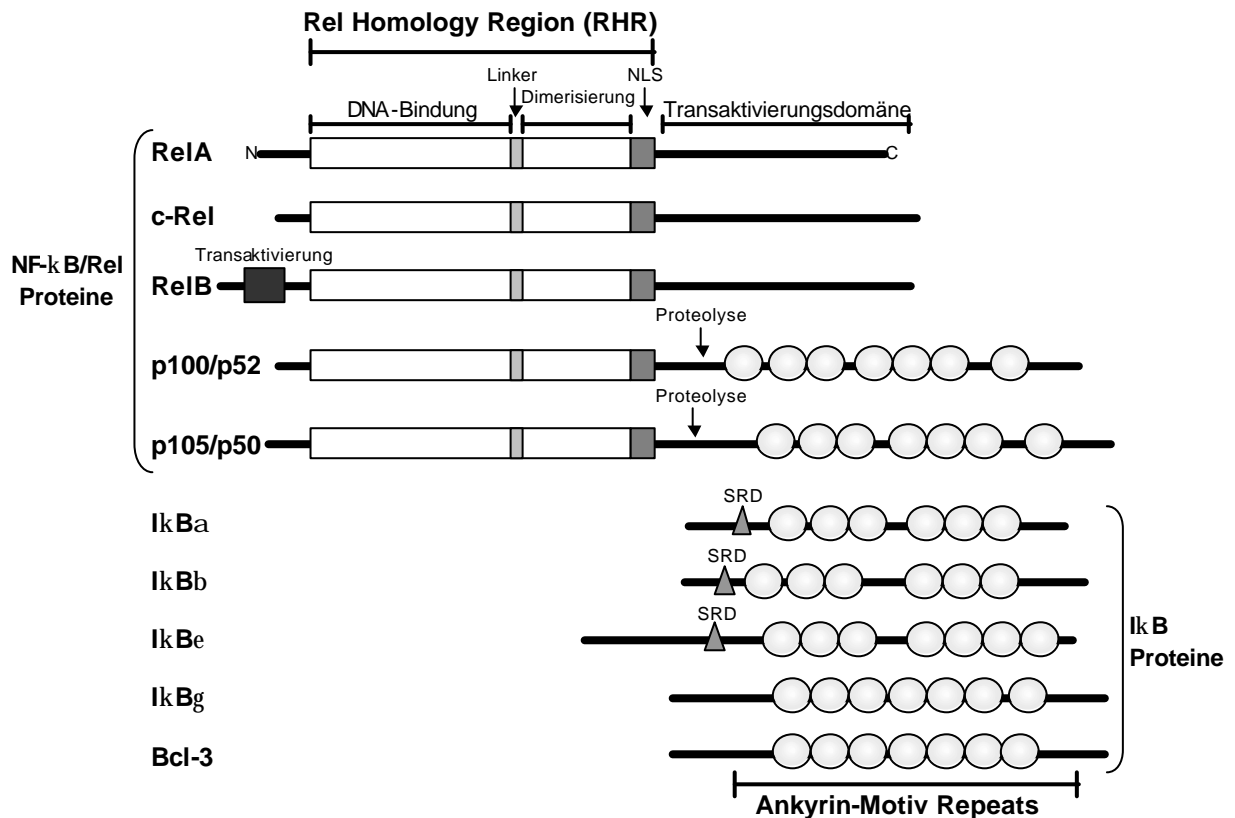


Abb. 11: Schematische Darstellung der Mitglieder der NF-κB/Rel- und IκB-Familie.

Die aminoterminalen SRD (Signal Response Domain) der inhibitorischen Proteine IκBα, IκBβ und IκBε ist als Dreieck dargestellt. Sie entspricht der Ubiquitinierungs- und Phosphorylierungsregion, die zur Degradation der Proteine führt. Erläuterungen im Text.

2.5.3.2.2 Aktivierung von NF-κB unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen

Die Aktivierung der cytoplasmatischen inaktiven Form von NF-κB-Transkriptionsfaktoren erfolgt durch die Stimulation der Zelle mit hauptsächlich pathogenen Signalen (siehe Abb. 12). Hierzu gehören inflammatorische Cytokine wie Interleukin-1β, der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα), bakterielle und virale Produkte wie Lipopolysaccharide (LPS), Mitogene wie Phorbol-ester, pro-apoptotische und nekrotische Stimuli wie freie Sauerstoffradikale und energiereiche Strahlung (Pahl, 1999). Aufgrund der Vielzahl von Stimuli wird NF-κB über die verschiedensten Signaltransduktionskaskaden aktiviert. Obwohl noch nicht endgültig bekannt ist, an welcher Stelle die Signaltransduktionswege der verschiedenen NF-κB induzierenden Stimuli konvergieren, sind die terminalen Schritte für fast alle NF-κB Induktoren identisch (siehe Abb. 12). Diese beginnen mit der Phosphorylierung spezifischer Serine der IκB-Einheit des NF-κB-Komplexes durch einen 700-900 kDa großen Multiproteinkomplex aus IκB-Kinasen (IKK). Bisher sind drei Komponenten der IKK bekannt, die Serin/Threonin Kinase IKKα und IKKβ als katalytische Komponente

sowie die regulatorische Untereinheit $\text{IKK}\gamma$ (Lee et al., 1998). Über den IKK-Komplex wird $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ an den Serinresten 32 und 36 und $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ an den Serinresten 19 und 23 phosphoryliert. Nach der Phosphorylierung werden die $\text{I}\kappa\text{B}$ Proteine an bestimmten Lysinresten nahe der phosphorylierten Serinreste von bestimmten Ubiquitin-Konjugationsenzymen polyubiquitiniert (beispielsweise wird $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ von einer E3 Ubiquitin-Protein-Ligase ubiquitiniert). Diese Ubiquitinierung führt zum selektiven nicht-lysosomalen Abbau des $\text{I}\kappa\text{B}$ über das 26S-Proteasom und zur Freisetzung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Baeuerle und Henkel, 1994). Nach der Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}$ ist die Kern-Translokationssequenz NLS von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ nicht mehr maskiert und aktives $\text{NF-}\kappa\text{B}$ kann nun in den Zellkern translozieren. Dort wird durch die Bindung an κB -Motive in Promotoren der Zielgene die Transkription aktiviert (Abb. 12).

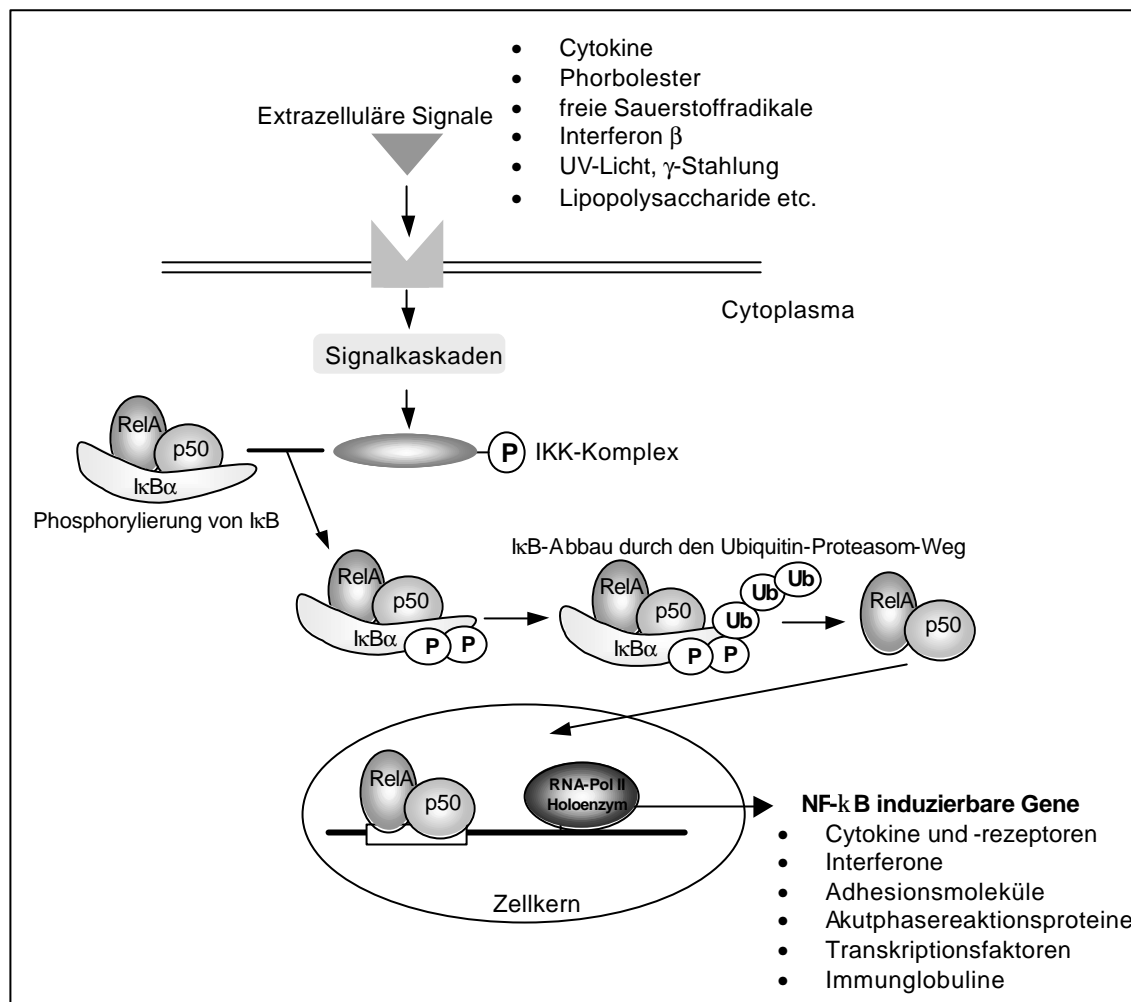


Abb. 12: Schematische Darstellung des Reaktionsweges, der nach zellulärer Stimulation zur Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ und Transkription der Zielgene mit κB -Motiv führt.

Als Antwort auf ein extrazelluläres Signal wird der IKK Komplex nach einer Serie bisher unvollständig charakterisierten Prozessen aktiviert, die an der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran ablaufen. Die Aktivierung des IKK-Komplexes bedingt die Phosphorylierung der inhibitorischen Untereinheit $\text{I}\kappa\text{B}$ des cytoplasmatischen Komplexes $\text{NF-}\kappa\text{B}$ an bestimmten Serinresten. In Folge wird $\text{I}\kappa\text{B}$ durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg degradiert und aktiver $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in den Zellkern translozieren. Dort wird durch die Bindung an κB -Motive in Promotoren- oder Enhancersequenzen die Transkription der Zielgene aktiviert.

Da konstitutiv aktiviertes NF- κ B für die Zelle schädlich ist, gibt es eine negative Feedback-Regulation, die zur Aufhebung der NF- κ B Antwort führt. Aufgrund einer NF- κ B Bindestelle im Promotor des I κ B α Gens ist aktiviertes NF- κ B in der Lage, die Expression seines Inhibitors I κ B α zu induzieren. Neu synthetisierte I κ B α -Moleküle akkumulieren zunächst im Cytosol der Zelle (Baldwin, 1996). Ist kein NF- κ B Bindungspartner im Cytosol vorhanden, translozieren die gebildeten I κ B α Inhibitoren in den Zellkern und interagieren mit DNA-gebundenem NF- κ B, wodurch das Dimer infolge einer höheren Affinität zu seinem Inhibitor von der DNA dissoziiert. Danach erfolgt über die Zellkernexportsequenz von I κ B α der Transport des Trimer in das Cytoplasma der Zelle (Ghosh et al., 1999).

2.5.3.2.3 Zielgene von NF- κ B/Rel-Transkriptionsfaktoren

Die Zielgene von NF- κ B enthalten im Promotor eine oder mehrere Kopien des κ B-Motivs mit der Konsensussequenz 5'-GGGRNNYYCC-3' (R = Purin, Y = Pyrimidin und N = x-beliebige Base). Das κ B-Motiv ist stark degeneriert, da die verschiedenen DNA-bindenden NF- κ B-Untereinheiten, aus denen sich die NF- κ B Transkriptionsfaktoren zusammensetzen, unterschiedliche Affinitäten und Spezifitäten für das κ B-Bindemotiv haben. Jedes Proteinmonomer des NF- κ B-Komplexes erkennt sequenzspezifisch eine Hälfte des κ B-Motivs. Beispielsweise bindet die p50 Untereinheit an die 5 bp lange Sequenz 5'-GGGAA-3', wohingegen RelA an die Sequenz 5'-GGAA-3' bindet. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus für die selektive Aktivierung von NF- κ B Zielgenen verantwortlich ist (Ghosh et al., 1999).

NF- κ B aktiviert in fast allen Zellen die Transkription einer Vielzahl von immunregulatorischen Genen. Hierzu gehören inflammatorische Cytokine z.B. IL-1, TNF und IL-6, Chemokine wie IL-8, immunregulatorische Oberflächenmoleküle und Zelladhensionsmoleküle, Interferone, Immunglobuline, Proteine der Akutphasereaktion, Transkriptionsfaktoren und vielen anderen, die hauptsächlich an der Immunantwort, an inflammatorischen und antiapoptotischen Prozessen, aber auch an der Kontrolle des Zellwachstums beteiligt sind. Es gibt mehr als 150 bekannte NF- κ B regulierte Gene (Pahl, 1999). Dies zeigt eindrucksvoll die biochemische Bedeutung dieser Transkriptionsfaktoren.

Im Nervensystem sind funktionelle NF- κ B-Komplexe in allen Zelltypen (Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten) vertreten. Hauptsächlich werden hier die Untereinheiten p50, p65 und I κ B α exprimiert. Aktiviert wird NF- κ B im Nervensystem zum einen durch Substanzen, die auch außerhalb des ZNS wirksam sind (siehe Abb. 12)

und zum anderen durch ZNS-spezifische Stimuli. Diese sind die elektrische Aktivität der Neuronen, die synaptische Übertragung durch Neurotransmitter (hauptsächlich Glutamat), Opiate, der Nervenwachstumsfaktor (NGF) und einige neurotoxische Peptide wie die Alzheimer-assoziierten Tau- oder β -Amyloid Proteine. Änderungen während der Entwicklung des Cortex, Hippocampus und Cerebellum aktivieren ebenfalls NF- κ B in Neuronen (O'Neill und Kaltschmidt, 1997). Vor allem die elektrische Aktivität und die synaptische Neurotransmission führen im Vergleich zu anderen Organen zu einer erhöhten Aktivität von NF- κ B im Gehirn. Zielgene von NF- κ B in neuronalen und glialen Zellen codieren ebenfalls für Proteine mit immunisierender und inflammatorischer Aktivität, darüber hinaus für Prozesse der neuronalen Plastizität, der Neuroprotektion und der neuronalen Entwicklung, die in diesen Zelltypen einzigartig sind (Mattson und Camandola, 2001; O'Neill und Kaltschmidt, 1997). Die Stimuli von NF- κ B in Neuronen und Gliazellen, die dadurch aktivierten Zielgene und die beobachteten Effekt sind in der Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tab. 2.2: Stimuli und Zielgene von NF- κ B im ZNS.

NF- κ B aktiviert die Transkription von Genen des ZNS, die für Cytokine codieren. Hierzu gehören der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), TGF β und Interleukin-6 (IL-6); für protektive Proteine: die Inhibitor-of-Apoptosis Proteine (IAP) und Bcl-2, die den programmierten (apoptotischen) Zelltod verhindern; Calbindin, einem Calcium-bindenden Protein, das die zellschädigenden, durch Calcium vermittelten Prozesse verhindert; die Mangan-Superoxid-Dismutase (Mn-SOD), einem antioxidativen Enzym der Mitochondrien; die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS), katalysiert die Umwandlung von L-Arginin zu Citrullin. Weitere Zielgene in Gliazellen sind das interzelluläre Adhesionsmoleküle und das Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP).

Stimulus	Zelltyp	Wirkung	Zielgene
TNF	Neuronen	Schutz vor Apoptose	Mangan-Superoxid-Dismutase Calbindin Glutamat-Rezeptoren Bcl-2, Calbindin
	Astrozyten	Schutz vor Apoptose	Mangan-Superoxid-Dismutase Calbindin
	Mikroglia	Cytokin-Bildung	TNF α , IL-6, TGF- β
Glutamat	Neuronen	Synaptische Plastizität Schutz vor Apoptose	Glutamat-Rezeptoren Mangan-Superoxid-Dismutase Calbindin
NGF	Neuronen	Schutz vor Apoptose	Bcl-2
Sauerstoffradikale	gliäre und neuronale Zellen	Schutz vor Apoptose	Mangan-Superoxid-Dismutase Calbindin
Amyloid β	Neuronen Mikroglia	protektive Stressantwort	Mangan-Superoxid-Dismutase, NOS, Cytokine
sAPP α	Neuronen	Neuroprotektion	Mangan-Superoxid-Dismutase

Die Aktivierung dieser NF- κ B-Zielgene dient zum einen der neuronalen Entwicklung und Plastizität, zum anderen dem Aufbau von schnellen anti-apoptotischen und immunologischen Reaktionen. Somit fungiert der Transkriptionsfaktor NF- κ B als Genschalter und zentraler Koordinator der protektiven Stressantwort und der synaptischen Plastizität im Nervensystem.

2.5.4 Induzierbare Transkriptionsfaktoren des Nervensystems

Extrazelluläre Signalmoleküle binden an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche und setzen dadurch eine koordinierte Kaskade der Signalweiterleitung in Gang, die einerseits eine kurzfristige Zellantwort auslösen können oder aber im Zellkern zur Expression von induzierbaren Transkriptionsfaktoren (iTFs) führen (siehe Abschnitt 2.5.2, Abb. 9). Die schnelle Expression von induzierbaren Transkriptionsfaktoren wurde erstmals 1987 im Nervensystem beschrieben. Die Transkription von iTFs in wenigen Minuten nach der transsynaptischen Stimulation wird wiederum von bereits vorhandenen, konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Das heißt iTFs sind selbst Zielgene von Transkriptionsfaktoren, und ihre Expression stellt die erste Welle der *de novo* Synthese nach zellulärer Stimulation dar. Aufgrund ihrer schnellen Induzierbarkeit gehören sie zur Gruppe der Immediate Early Genes (IEGs). Ihre Zahl ist im Nervensystem besonders hoch, allein im Hippocampus werden nach Krampfaktivität (epileptischen Anfällen) Hunderte von Genen in weniger als einer Stunde induziert (Herdegen, 1996).

Die Aktivierung und Expression von Genen, die für induzierbare Transkriptionsfaktoren codieren, gilt gegenwärtig als wichtiges molekulares Korrelat für langanhaltende plastische Änderungen von Nervenzellen. c-Fos und c-Jun sind als Immediate Early Genes bekannt, da ihre Transkription sehr bald nach Reizung oder Verletzung von Nervengewebe nachgewiesen werden kann.

2.5.4.1 Der Transkriptionsfaktor AP-1

Der Transkriptionsfaktor AP-1 (activator protein-1) ist ein kollektiver Terminus. Damit werden verschiedene Protein-Dimere bezeichnet, die als induzierbare Transkriptionsfaktoren fungieren. Zu ihnen zählen die Mitglieder der AP-1-Familie Fos, Jun oder ATF. AP-1 bindet an eine spezifische, palindromische Konsensussequenz 5'-TGAG/CTCA-3', die ebenfalls als AP-1 Bindungsstelle bezeichnet wird (Angel et al., 1987).

Fos- und Jun-Proteine sind Mitglieder zweier Genfamilien, deren gemeinsames Motiv der Leucin-Zipper mit basischer DNA-Bindungsdomäne (bZIP, siehe Abschnitt 2.4.1) ist. Die Proteine der Jun-Familie, zu denen c-Jun, JunB und JunD gehören, können sowohl Heterodimere mit Mitgliedern der Fos- und ATF-Familien als auch Homodimere mit den Mitgliedern der eigenen Familie bilden. Die Mitglieder der Fos-Familie c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2 bilden nur Heterodimere (Smeal et al., 1989).

Generell kann AP-1 als Antwort auf eine Reihe von Stimuli wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Phorbolester, Carcinogenen, Polypeptidhormonen und

Stressfaktoren aktiviert werden und die Transkription von AP-1-abhängigen Zielgenen regulieren. Die Familie der AP-1 Proteine wirken sowohl aktivierend als auch hemmend auf die Transkription der Zielgene, somit verstärken, modulieren und spezifizieren sie die Gentranskription. Sie verknüpfen extrazelluläre Stimuli mit längerfristigen zellulären Antworten. AP-1 spielt damit in vielen zellulären Prozessen der Zellproliferation, -differenzierung und -transformation, Entzündungsreaktionen und zellulären Stressantwort eine entscheidende Rolle.

Als Hauptvertreter der AP-1-Komplexe und Prototypen der induzierbaren Transkriptionsfaktoren des Nervensystems werden im Folgenden die Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun beschrieben.

2.5.4.1.1 Die AP-1 Mitglieder c-Fos und c-Jun

Das Fos-Gen wurde erstmals 1982 als Onkogen des murinen Fibrosarkoma-Virus entdeckt, das osteogene Sarkome induziert (Curran et al., 1982). Wenig später fand man ein homologes Gen mit physiologischer Funktion in normalen Zellen, das sich gegenüber seinem viralen (v-Fos) Gegenstück als zelluläres Fos-Gen (cellular, c-Fos) abgrenzen ließ. Drei Jahre später gelang es, die virale und zelluläre Form des Jun-Gens (v-Jun und c-Jun) zu isolieren, dessen virales Protein Fibrosarkome in Hühnern hervorruft (Bohmann et al., 1994). Die zellulären Onkogene werden als Protoonkogene bezeichnet, da deren unkontrollierte Expression Tumore verursachen kann. Die im Zellkern lokalisierten Protoonkogene wie c-Fos und c-Jun bilden eine Gruppe von Immediate Early Genen (IEGs), das heißt sehr früh exprimierten Genen, die bei vielen Signalkaskaden die erste Antwort der Zellen auf extra- oder intrazelluläre Reize darstellen und deren Produkte als Transkriptionsfaktoren die Aktivierung der späten Genantwort veranlassen. Diese IEGs werden sehr schnell nach dem Stimulus exprimiert, die RNA hat eine sehr kurze Halbwertszeit von maximal 30 Minuten und ist daher nur über einen begrenzten Zeitraum nachweisbar (You et al., 1992).

2.5.4.1.2 Regulation der Genexpression von c-Fos

Die Expression des c-Fos-Gens wird sehr schnell durch eine Reihe unterschiedlicher Faktoren induziert. Dazu gehören Wachstumsfaktoren wie NGF, EGF oder PDGF, Insulin, Phorbolster und transsynaptische Erregung von Neuronen. Letztendlich führen diese Stimuli zur Aktivierung der Transkription des c-Fos-Gens, so dass ein direkter Bezug zwischen Stimulus und Promotor besteht.

Der c-Fos Promotor beinhaltet neben der TATA-Box mehrere cis-regulierende Sequenzelemente, die eine hohe Konservierung zwischen den einzelnen Spezies Maus, Ratte und Mensch aufweisen (Wang und Howells, 1994). Zu den wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die nach Bindung an diese cis-Elemente die Transkription von c-Fos induzieren, gehören das *cyclische AMP response element binding protein* (CREB), der *Serum Response Faktor* (SRF), der *Sis Inducible Faktor* (SIF), der *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) und schließlich AP-1 selbst. Damit steht die Expression von c-Fos am Ende mehrerer Signal-Transkriptions-Kaskaden, die durch Hormone, Neurotransmitter (transsynaptische Erregung von physiologischen oder pathophysiologischen Reizen (epileptische Krampfaktivitäten und Schmerzen)), Interleukine, Interferone oder Mitogene stimuliert werden (Herdegen und Leah, 1998). Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen von Ca^{2+} oder cAMP stimulieren die c-Fos Transkription über das CRE-Element (unter Einbeziehung des Proteinkinase A Signalweges und Phosphorylierung von CREB). Interleukine und Interferone aktivieren den JAK-STAT-Signalweg, der auf das SIE-Element des c-Fos Promotors zusteuert. Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (EGF, PDGF, NGF, BDNF und Serum) oder Phorbolster aktivieren die Kaskade der *extracellular signal-regulated Kinasen* (ERK) des MAP-Kinase-Netzwerkes (*Mitogen-aktivierte Proteinkinase* = MAP-Kinase), deren Substrat der Transkriptionsfaktor Elk-1 ist. Dieser bindet zusammen mit dem Serum Response Faktor an das SRE-Element und aktivieren gemeinsam die Expression des c-Fos Gens. CREB und SRF sind die wichtigsten Induktoren der c-Fos-Transkription. Diese konstitutiven Transkriptionsfaktoren werden auch im Nervensystem auf einem hohen, möglicherweise maximalen Niveau exprimiert.

Alle hier genannten Transkriptionsfaktoren werden durch die von der Signalübertragung ausgelöste Phosphorylierung aktiviert, um dann mit den GTFs der basalen Transkriptionsmaschinerie direkt oder unter Vermittlung von Adapterproteinen zu interagieren. Ihre Aktivierung erfolgt innerhalb weniger Sekunden und dieser Schritt ist eine Voraussetzung für die schnelle Induktion von c-Fos. Ihre Dephosphorylierung beendet oder verhindert die Aktivierung des c-Fos Promotors. Die Induktion von c-Fos wird weiterhin durch das eigene Genprodukt nach Dimerisierung mit Jun-Proteinen und

Bindung an das AP-1 Sequenzelement inhibiert. Ein Mechanismus, der als negative Autoregulation bezeichnet wird.

Erst nach Dimerisierung mit Jun-Proteinen kann c-Fos an das AP-1-Sequenzelement binden. Anschließend aktiviert c-Fos die Transkription der Zielgene durch direkte Wechselwirkung der C-terminalen Transaktivierungsdomäne mit dem TBP und dem TFIID-Komplex. Promotoren, denen eine TATA-Box fehlt, kann c-Fos durch Interaktion mit dem Initiator-Element aktivieren (Herdegen und Leah, 1998). c-Fos ist somit ein Aktivator der Transkription.

2.5.4.1.3 Regulation der Genexpression von c-jun

Der c-Jun Promotor wird ebenfalls von mehreren Transkriptionsfaktoren wie CREB/ ATF-1, *Serum Response Faktor* (SRF), AP-1 und ATF-2 reguliert. Wichtigster Induktor der c-Jun Transkription im Nervensystem ist der konstitutive Transkriptionsfaktor ATF-2. ATF-2 ist Effektor einer Untergruppe der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase- (MAPK) Kaskade, die als *c-Jun NH₂-terminale Kinase* (JNK) -Kaskade oder als *Stress Activated Protein Kinase* (SAPK) –Kaskade bezeichnet wird. Die Phosphorylierung von ATF-2 durch diese Kinasen induziert die Expression von c-Jun. Damit steht die Expression von c-Jun am Ende einer Signal-Transkriptions-Kaskade, die durch zelluläre Stressoren (Hypoxie, Ischämie, Störung der ionalen Homöostase, UV-Licht, γ -Strahlung etc.), Immunfaktoren (Interferone und Interleukine) und Mitogene (NGF, FGF, EGF, BDNF etc.) stimuliert wird (Chen und Tan, 1999). Interessanterweise wird die Aktivierung des c-Jun Promotors im Gegensatz zu dem c-Fos Promotor durch eine positive Autoregulation vermittelt.

Die Signalkaskade des MAP-Kinase-Signalweges stellt sich inzwischen als ein komplexes Netzwerk paralleler Signalstränge dar. In Eukaryonten sind bisher sechs dieser MAPK-Signaleinheiten beschrieben worden. Die wachsende Zahl der beteiligten Signalmoleküle können mit anderen interagieren, so dass verschiedene Signalwege miteinander verknüpft werden und eine fast unerschöpfliche Vielfalt von hochregulierten zellulären Reaktionen ermöglicht wird.

2.5.4.1.4 Regulation der c-Fos und c-Jun Proteinaktivitäten

Die Proteinaktivitäten von c-Fos und c-Jun als Teil des Transkriptionsfaktors AP-1 unterliegen nach ihrer Synthese einigen Regulationsmechanismen. Hierzu zählen die posttranslationale Phosphorylierung und die Interaktion mit anderen Zellproteinen:

Posttranslationale Modifikationen

Die posttranslationalen Modifikationen von c-Fos und c-Jun durch Phosphorylierungen im C- und N-terminalen Ende durch Kinasen und Dephosphorylierungen durch Phosphatasen erhöhen oder vermindern die Transaktivierung und DNA-Bindung der AP-1 Proteine. Diese Modifikationen leisten damit einen wesentlichen Beitrag zur spezifischen Transkriptionskontrolle durch c-Fos bzw. c-Jun.

Für die Transaktivierungsaktivität von AP-1 sind die Modifikationen der Aktivierungsdomänen der einzelnen Proteine des AP-1-Komplexes von Bedeutung. Die Transaktivierungsdomäne bei c-Jun ist N-terminal lokalisiert und besteht aus drei kurzen Regionen, die durch eine Anhäufung von negativ geladenen Aminosäuren charakterisiert ist (Angel et al., 1989). Die Phosphorylierung der aminoterminalen Aktivierungsdomäne an den Serinresten 63 und 73 von c-Jun durch JNK (c-Jun-NH₂-terminale Kinasen) vermindert die Ubiquitinierung, erhöht somit die Stabilität und verstärkt das Transaktivierungspotenzial dieses Faktors (Musti et al., 1997).

Das N- und C-terminale Ende des c-Fos-Proteins enthält mehrere autonome Regulationsdomänen, die durch Phosphatgruppenübertragung aktiviert werden können. Die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A betrifft vor allem die C-terminalen Serinreste von c-Fos und scheint ein wichtiger regulatorischer Schritt in der Aktivitätskontrolle darzustellen. C-terminale Serinreste sind auch Substrat anderer Proteinkinasen wie der MAP-Kinase und der RS-Kinase (90-kDa ribosomale S6 Kinase), die als wachstumsregulierte Enzyme in die posttranslationelle Modellierung des Proteins eingreifen und die Stabilität wie auch die Transaktivierungsaktivität erhöhen (Chen et al., 1996).

Wechselwirkung mit anderen Proteinen

Protein-Protein-Wechselwirkungen haben große Bedeutung für die Kontrolle der Aktivität der Transkriptionsfaktoren.

Die nukleären Rezeptoren für Retinoide oder Glucocorticoide können mit AP-1 in der Weise wechselwirken, dass sie entweder seine Bindung an die DNA verhindern oder mittels Transrepression die Transaktivierungsaktivität des gebundenen Transkriptionsfaktors inhibieren (Nagpal et al., 1995).

Darüber hinaus sind transkriptionelle Coaktivatoren beschrieben, die mit c-Jun interagieren können (beispielsweise das *CREB binding protein*, CBP und *Jun activation domain binding protein*, JAB1). Die Phorbol-ester induzierte Transaktivierungsaktivität von AP-1 kann durch das Interferon- induzierbare Protein p202 inhibiert werden (Claret et al., 1996).

Weiterhin bestimmen die Dimerisierungspartner maßgeblich, welcher Promotor aktiviert wird. So führt die Dimerisierung von Fos- mit ATF-Proteinen zur Bindung an die CRE-

Erkennungssequenz 5'-TGACGTCA-3', während die Dimerisierung von Fos-Proteinen mit Jun-Proteinen zur Bindung an die AP-1 Konsensussequenz 5'-TGAG/CTCA-3' führt. Wie c-Fos bindet auch c-Jun an die AP-1 Konsensussequenz, kann jedoch mit einer größeren Zahl von Transkriptionsfaktoren und DNA-Sequenzen assoziieren.

2.5.4.1.5 Die biologische Wirkung von c-Fos und c-Jun im Nervensystem

Allgemein vermittelt der Transkriptionsfaktor AP-1 die zellulären Prozesse der Zellproliferation, -differenzierung und -transformation sowie Entzündungsreaktionen und Apoptose.

Im Nervensystem regulieren die c-Fos und c-Jun Proteine bzw. der resultierende AP-1 Transkriptionsfaktor eine Vielzahl von Genen, wobei sich grundsätzlich nicht zwischen einem von c-Jun und einem von c-Fos kontrollierten Promotor unterscheiden lässt. Jedoch gibt es zahlreiche Bedingungen, unter denen entweder nur oder überwiegend c-Jun oder nur c-Fos exprimiert werden. Zielgene von c-Fos sind Neurotransmitter-synthetisierende Enzyme wie die Tyrosinhydroxylase (ein Schlüsselenzym für die Synthese der Transmitter Serotonin, Dopamin, Dopa und Octopamin), Neuropeptid-Vorläufer wie Proenkephalin und Prodynorphin (körpereigene Opioide), Wachstumsfaktoren wie der Nerve Growth Faktor (NGF), gliale Proteine (GFAP, glial fibrillary acidic protein) und der Gewebepelminaktivator tPA (Herdegen und Leah, 1998).

Die Charakterisierung der Zielgene von c-Fos und die Verwendung von Knock-Out-Organismen und Antisense-Oligonukleotiden, die durch Hybridisierung mit der mRNA die Translation von c-Fos im Tiermodell *in vivo* verhindern, hat einige molekulare und biologische Effekte von c-Fos aufgezeigt. Danach ist c-Fos am späten ontogenetischen Zelltod von Nervenzellen beteiligt, an der Verschiebung des zirkadianen Rhythmus, an der Entstehung analgetischer Reaktionen durch Synthese opioider Neuropeptide oder an der verminderten Expression des Neuropeptids Neurotensin. Des Weiteren wird die c-Fos Genexpression in Neuronen hauptsächlich durch CREB induziert, so dass auch dieser Faktor an der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses beteiligt ist (Gass und Herdegen, 1997).

Im adulten Nervensystem vermittelt c-Jun wichtige Funktionen für die Integration neuroimmunologischer Signale, die Reparatur geschädigter Neuronen und den neuronalen Zelltod. Zielgene von c-Jun codieren für synaptische und axonale Proteine wie GAP-43, einem Protein für neuronales Wachstum und Synaptogenese, die Tumornekrosefaktoren TNF α und TNF β , Interleukine, Fas-L, das β -Amyloid-Protein und die Cyclo-oxygenase-2.

Unter den verschiedenen, miteinander interagierenden AP-1 Molekülen hat c-Jun eine besondere Bedeutung im Nervensystem. Dieser Transkriptionsfaktor ist der einzige, der nach besonders ausgeprägten neuronalen Schädigungen hochreguliert wird, in Situationen also, in denen das Neuron an der Grenze zwischen Regeneration und Degeneration steht. Offenbar kommt der Expression von c-Jun eine Art Weichenstellung zu, wobei der molekulare Kontext entscheidend dafür ist, ob c-Jun in einem zellulären Regenerations- oder Degenerationsprogramm mitwirkt (siehe Abschnitt 2.5.5). Der c-Jun Transkriptionsfaktor vermittelt demnach degenerative und regenerative Prozesse im Nervensystem. Er wird im Tierexperiment nach Ischämie, Hypoxie, Exzitotoxizität, Entzug und Gabe von Wachstumsfaktoren, Durchtrennung und Regeneration von Nervenbahnen, UV-Bestrahlung, Morbus Alzheimer, Multipler Sklerose oder der amyotrophischen Lateralsklerose (ALS, Degeneration von motorischen Nervenzellen im Rückenmark und in Hirnnerven) exprimiert (Herdegen et al., 1997). Eine erhöhte Synthese wurde auch in Gewebeproben von Patienten mit Alzheimer, Multipler Sklerose oder ALS nachgewiesen. Andererseits wird c-Jun über Wochen in Neuronen exprimiert, die durch ein Nerventransplantat regenerieren, und seine Expression steigt mit dem „Wohlbefinden“ der geschädigten Neuronen. Seine degenerative oder protektive Wirkung entfaltet c-Jun mit oder ohne Fos-Proteine über die Transkriptionskontrolle von Genen, die für degenerative (Fas-Ligand, Calpain), für regenerative (GAP-43) oder inflammatorisch-immunologisch wirksame (Interleukin-2, TNF α , Cyclo-oxygenase-2) Proteine codieren.

2.5.5 Die Regulation der neuronalen Stressantwort: Integration regenerativer, apoptotischer und immunologischer Reaktionen

Die Antwort von Neuronen auf chronisch-degenerative oder akute Verletzungen umfasst ein Reaktionsmuster, das in nicht-neuronalen Zellen (Lymphozyten, Hepatozyten, Fibroblasten) gut analysiert ist und als Stressantwort auf UV-Bestrahlung, Bildung von Radikalen, Ischämie-Hypoxie, Stimulation mit Cytokinen, Überladung mit Calcium oder mechanischen Verletzungen beschrieben wurde. Diese Stressantwort beinhaltet die intrazelluläre Aktivierung von TNF- und Fas-Rezeptor-abhängigen Signalkaskaden, JNK-Kinasen und Phosphatasen sowie die Expression der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 (hauptsächlich c-Jun). Interessanterweise können nun diese Veränderungen auch in Neuronen und im adulten Nervensystem nach Ischämie-Hypoxie, Parenchymzerstörung, Nervenverletzung, Exzitotoxizität oder Entzug von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren gefunden werden, wo sie zur Protektion und zum programmierten Zelltod von Neuronen beitragen (Herdegen, 1997). Somit ist auch die neuronale Stressantwort in Analogie zu Immunzellen ein Teil der Überlebensstrategie als auch des programmierten Zelltodes (Apoptose).

Das Nervensystem besitzt einige dichotome Systeme, die protektiv und degenerativ wirken können. Ein relativ gut beschriebener Signalweg wird über das Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor α /Fas-System eingeleitet. Regulatorische Effektoren der durch Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Fas-Ligand (Fas-L) vermittelten Signale sind die Transkriptionsfaktoren c-Jun, c-Fos und NF- κ B (Abb. 13). Im Nervensystem aktiviert TNF α protektive intraneuronale Programme. So zeigen Mäuse ohne TNF α -Rezeptoren eine verstärkte Neurodegeneration nach Ischämie oder nach epileptischen Krämpfen. Als Mechanismus werden die Stabilisierung der Calcium-Homöostase und die verminderte Bildung von Radikalen durch erhöhte Superoxiddismutase (SOD)-Expression angesehen. Dieses Gen wird von NF- κ B reguliert. Weiterhin verhindert der von TNF α aktivierte Second Messenger Ceramid mittels Translokation von NF- κ B den Glutamat-induzierten neuronalen Zelltod. In Autopsieproben von Patienten mit Multipler Sklerose wurde vermehrt Fas-L in absterbenden Neuronen gefunden. Da bei Multipler Sklerose vermehrt c-Jun exprimiert wird und FasL ein Zielgen von AP-1/c-Jun ist, beschleunigt wahrscheinlich c-Jun über die Synthese von Fas-L neurodegenerative Prozesse. Zusammengefasst bilden TNF α und Fas-L sowie die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 ein funktionales Netzwerk zur Umsetzung von extraneuronalen immunologischen Signalen in degenerative oder protektive Antworten (Abb. 13, Herdegen, 1997).

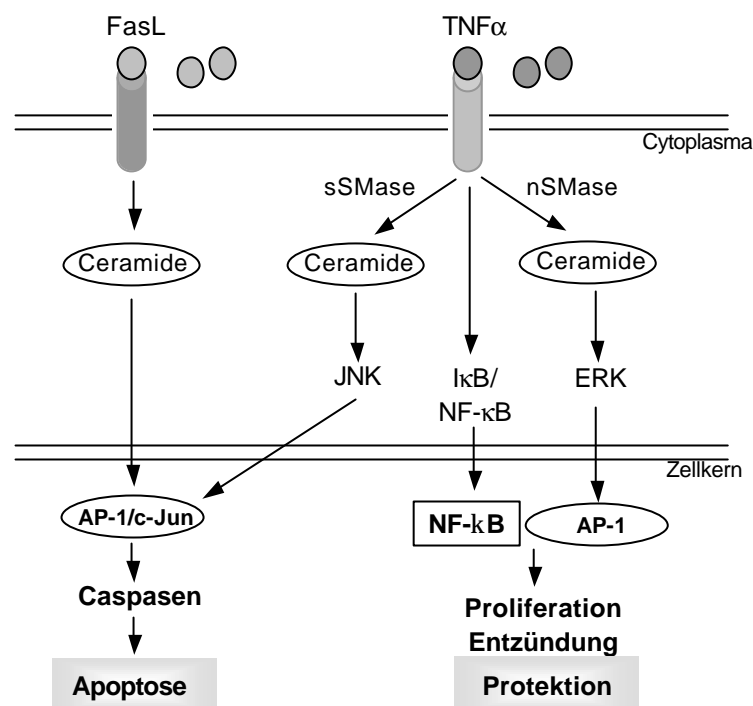


Abb. 13: Mechanismus der neuronalen Stressantwort

Während die Aktivierung des Fas-Rezeptors überwiegend apoptotisch über die Expression von c-Jun wirkt, kann der TNF α -Rezeptor verschiedene intraneuronale Reaktionen hervorrufen wie die Bildung von Ceramid durch Aktivierung von sauren oder neutralen Sphingomyelinasen (sSMase, nSMase), Aktivierung von JNK und ERK sowie die Aktivierung von NF- κ B und AP-1 mit nachfolgender Induktion von immun- und inflammatorisch-responsiven Genen.

2.6 Anwendungsgebiete induzierbarer Promotoren – Regulation der Transgenexpression

Die Aufklärung der Mechanismen, nach denen regulatorische Proteine die Transkription von Promotoren beeinflussen, hat zur Entwicklung von hochregulierbaren, synthetischen Genexpressionssystemen geführt. Schwerpunkte der Anwendung dieser Expressionssysteme bilden hierbei die kontrollierte Produktion rekombinanter Proteine, Genfunktionsanalysen *in vitro* und *in vivo*, die Herstellung transgener Tiere als Modellsysteme für bestimmte Erkrankungen, sowie die Zell- oder Gentherapie am Menschen. Die präzise Kontrolle der Genexpression ist somit zu einem unverzichtbaren Werkzeug zur Untersuchung komplexer physiologischer und pathophysiologischer Prozesse geworden.

Genexpressionssysteme in Eukaryonten sollten wie auch in Prokaryonten zum einen eine große Regulationsbreite aufweisen (das heißt niedrige Promotoraktivitäten im reprimierten Zustand und hohe Promotoraktivitäten im induzierten Zustand) und zum anderen einfach induzierbar sein (zum Beispiel durch kostengünstige Chemikalien). Eine gute Reprimierbarkeit ist wünschenswert, wenn Proteine mit potenziell toxischer Wirkung produziert werden sollen, hohe Expressionsraten erleichtern die Aufreinigung eines Proteins. Diese zeitliche Kontrolle ist vor allem wichtig bei der Herstellung von Knock-Out Organismen. Gewöhnliche Knock-Out Tiere tragen Genmutationen, die in einem vollständigen Ausfall des betroffenen Gens resultieren. Diese Mutationen werden schon in die Zellen der Keimbahn eingeführt. Dies hat zur Folge, dass alle Zellen des daraus entstehenden Organismus, die Genveränderung aufweisen. Handelt es sich bei dem veränderten Gen um ein lebensnotwendiges, so kann sein Ausschalten zu schwerwiegenden Störungen in der Entwicklung oder zu einem Absterben des Organismus führen. Obwohl diese Knock-Outs sehr dazu beigetragen haben, unser Verständnis über die Funktion dieser Gene in der frühen Entwicklung des Embryos zu verbessern, erlauben sie es nicht, ihre Funktion während späterer Stadien oder im adulten Tier zu untersuchen. Gerade dies ist aber oft wünschenswert, um menschliche physiologische als auch pathophysiologische Prozesse im Tiermodell zu studieren. Zur zeitlichen Kontrolle der Genexpression in Eukaryonten können zum einen homologe Promotoren, das heißt natürlich vorkommende Promotoren oder künstliche (heterologe) Promotoren eingesetzt werden. Homologe Promotoren haben den Nachteil, dass die induzierende Substanz endogen gebildet wird, also im Organismus ständig schwankende Konzentrationen des Induktors vorhanden sind. Dadurch ist eine zeitliche Kontrolle der Genexpression nicht möglich und führt zu einer vorzeitigen Hintergrundaktivität. Synthetische Transkriptionssysteme beseitigen diese Probleme. Zur Anwendung kommen hier prokaryontische Regulationselemente. Obwohl eukaryontische Promotoren komplexere Regulationsschemata aufweisen als prokaryontische, sind die Prinzipien, nach denen sie

reguliert werden, dennoch dieselben. Deshalb können mit Hilfe prokaryontischer Regulatorproteine auch in höheren Eukaryonten die Aktivitäten eines Promotors sehr effizient induziert werden (Gingrich und Roder, 1998).

Ein induzierbares heterologes Expressionssystem, mit dem Gene in Säugerzellen und transgenen Tieren gezielt an- und abgeschaltet werden können, ist das Tetracyklin-regulierte Genexpressionssystem (TET-System). Das Prinzip ist in Abbildung 14 dargestellt.

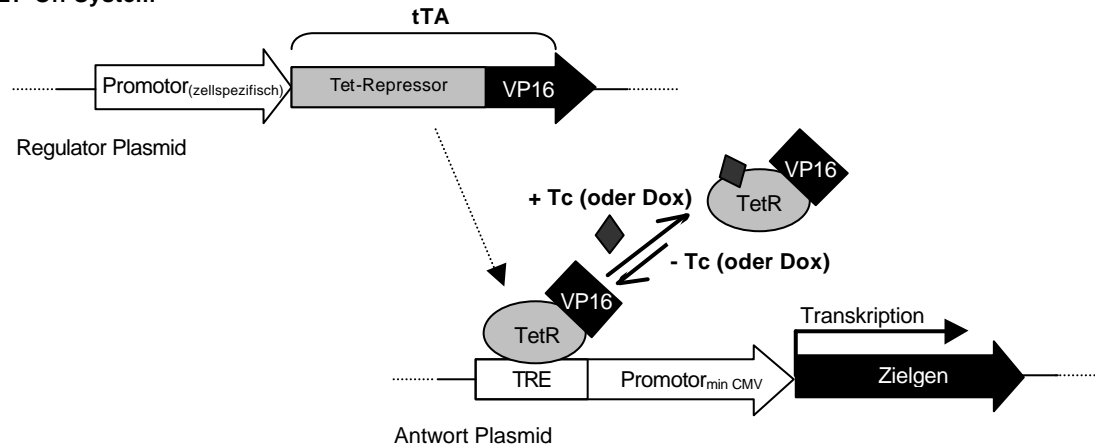
Das erste TET-System wurde von Gossen und Bujard an der Universität Heidelberg entwickelt (Gossen und Bujard, 1992; Gossen, 1995). Dieses über Tetracyklin induzierbare Genexpressionssystem führt zu hohen Expressionsraten der Zielgene und kann präzise reguliert werden. Das System besteht aus zwei zentralen Komponenten, dem Tetracyklin-regulierbaren Transaktivator (tTA) und der Tetracyklin-Operatorsequenz, an die der Transaktivator bindet. Durch Fusion des prokaryontischen Tetracyklin-Repressors (Tet-R, aus dem Tetracyklinresistenz-Operon von *E. coli*) mit der Aktivierungsdomäne des VP16-Transkriptionsaktivators vom Herpes Simplex-Virus entsteht der Tetracyklin-regulierbare Transaktivator (tTA). Der Tet-Repressor ist für diese Zwecke besonders geeignet, da er von allen bekannten prokaryontischen Regulatorproteinen die höchste spezifische Bindung zu seiner Erkennungssequenz aufweist und hervorragend durch subtoxische Mengen an Tetracyklin bzw. dessen Analogon Doxycyclin induziert werden kann. Der Transaktivator wird in der Regel von einem konstitutiven eukaryontischen Promotor transkribiert. Diese Elemente sind in einem Plasmid integriert, das als Regulator-Plasmid bezeichnet wird.

Das zu exprimierende Gen bzw. die cDNA wird in ein sogenanntes Antwort-Plasmid kloniert, das stromaufwärts einen eukaryontischen, nicht transkriptionskompetenten Minimalpromotor enthält (z.B. den Minimalpromotor des Cytomegalovirus). Stromaufwärts des Minimalpromotors ist die Operatorsequenz für den Transaktivator, das sogenannte Tet-Responsive-Element (TRE), lokalisiert. Beide Plasmide werden in eukaryontische Zellen oder Organismen transferiert und stabil in das Genom integriert. In Abwesenheit von Tetracyklin bindet der Tetracyklin-abhängige Transaktivator (tTA) an das TRE-Element und aktiviert die Transkription des Zielgens. Die Expression des nachgeschalteten Gens kann so über einen mehr als 10.000fachen Bereich stimuliert werden. Gibt man Tetracyklin oder dessen Analogon Doxycyclin hinzu, so entsteht ein Tetracyklin-tTA-Komplex, der eine Konformationsänderung des Repressor-Proteins bewirkt. Dieses kann dann nicht mehr an das TRE-Element binden, die Transkription wird abgeschaltet. Dieses erste entwickelte induzierbare Tet-Expressionssystem wird TET-Off bezeichnet.

Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens ist das TET-On System (siehe Abb. 14 B); Gossen, 1995). Dieses basiert auf einem reversen Tetracyklin-Repressor. Er unterscheidet sich vom Wildtyp-Repressor durch Austausch von vier Aminosäuren. Wird dieser

Repressor mit der VP16-Aktivierungsdomäne fusioniert, entsteht ein reverser Tetracyklin-regulierbarer Transaktivator (rtTA), der die Transkription des Zielgens nur in Anwesenheit von Doxycyklin aktiviert. Der rtTA ist 100fach sensitiver gegenüber Doxycyklin als Tetracyklin, weshalb im TET-On System ausschließlich Doxycyklin zur Induktion verwendet wird.

A) TET-Off System



B) TET-On System

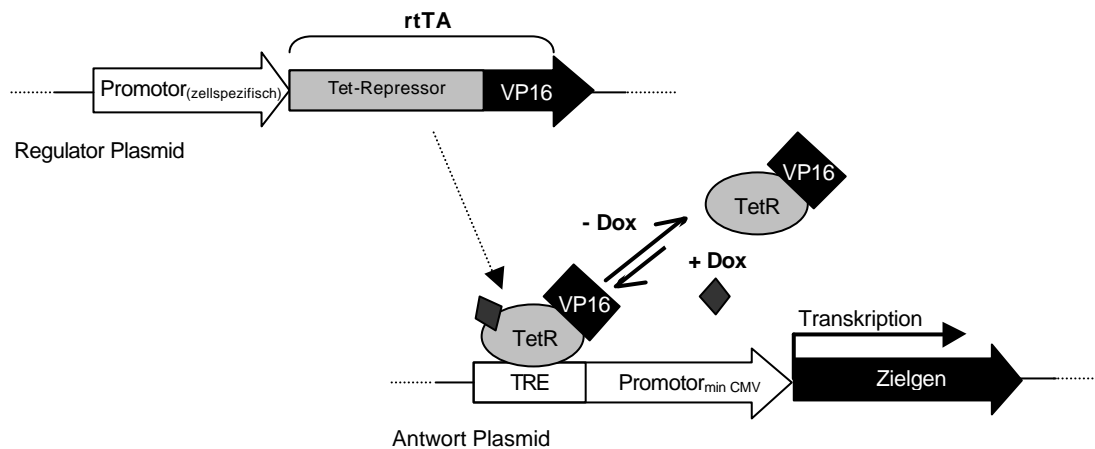


Abb. 14: Das TET-Off und TET-On-System.

TET-Off: Der Tetracyklin kontrolliert Transaktivator (tTA) ist eine Fusion des Wildtyp Tetracyklin-Repressors (TetR) mit der VP16 Aktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus. Der tTA steht unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors. In Abwesenheit von Tetracyklin oder Doxycyklin bindet der tTA an die Operatorsequenz TRE innerhalb eines transkriptionsinaktiven Minimalpromotors, wodurch die Transkription des zu exprimierenden Gens erfolgt. Hingegen ist der Transaktivator in Anwesenheit von Tetracyklin bzw. Doxycyklin inaktiv, und das Gen wird nicht transkribiert. **TET-On:** Verwendet wird hier ein reverser Transaktivator (rtTA), der die Transkription des Zielgens in Anwesenheit von Doxycyklin aktiviert. Stellt man den Transaktivator unter die Kontrolle eines zell- oder gewebespezifischen Promotors, so kann die Transkription des Gens zell- oder gewebespezifisch erfolgen.

Die Eigenschaften des reversen TET-Off Systems sind vor allem für *in vivo* Studien von Vorteil, die eine schnelle Aktivierung der Zielgene erfordern. In diesem Fall hängt die Induktionskinetik dann nicht von der biologischen Halbwertszeit des Effektors ab.

Ebenfalls von Vorteil ist das reverse TET-On System für Zellen oder Organismen, die über lange Zeit im reprimierten Zustand verweilen sollen, wo Langzeit-Einwirkungen des Tetracyklins unerwünscht oder unmöglich (z.B. bei der Gentherapie) sind.

Das TET-System kann auch im Gehirn induziert werden, denn Tetracyclin und Doxycyclin können die Blut-Hirn-Schranke passieren (Lee et al., 1998).

Stellt man den Transaktivator in einem transgenen Organismus unter die Kontrolle eines zell- oder gewebespezifischen Promotors, so kann die Aktivität eines Gens gezielt in einem bestimmten Zelltyp oder Organ kontrolliert werden. So lässt sich nicht nur die Menge, sondern auch der Ort der Expression genau bestimmen und regulieren. Mehrere gewebespezifische Promotoren stehen zu diesem Zweck zur Verfügung (siehe Tabelle 2.3).

Tab. 2.3: Zellspezifische Expression unter Verwendung des TET-Systems

Gewebespezifischer Promotor	Zielzellen bzw. -gewebe
Proteinkinase <i>lck</i> -Promotor	T-Zellen
CD19 Promotor	B-Lymphozyten
Keratin5 (<i>K5</i>) Promotor	Haut
α A-Kristallin-Promotor	Augenlinse
Adipozyten Protein (<i>aP2</i>) Promotor	Fettzellen
α -Myosin schwere Ketten (<i>aMyHC</i>) Promotor	Herzmuskelzellen
β -Lactoglobulin (<i>BLG</i>) Promotor	Brustgewebe
Surfactant Protein C (<i>SPC</i>) Promotor	Lunge
LAP Promotor	Leber
Keratin 14 (<i>K14</i>) Promotor	Epithelzellen
Keratin 6 (<i>K6</i>) Promotor	Keratinocyten
Tek oder Tie Promotor	Endothelzellen
Prion Protein Promotor	Gehirnzellen
Enolase Promotor	Neuronen
δ FosB Promotor	Neuronen
α -Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II (α CaMKII) Promotor	Pyramidale Zellen des Hippocampus

Die Kombination induzierbarer und gewebespezifischer Promotoren ermöglicht die Regulation einer zeitlich und örtlich begrenzten Genexpression. Mit Hilfe dieses induzierbaren Genexpressionssystems können also in transgenen Organismen gezielt gewebe- bzw. zellspezifisch Genaktivitäten an- und abgeschaltet werden. Auf diese Weise lässt sich die Rolle einzelner Gene in bestimmten Geweben und zu definierten Zeitpunkten untersuchen. Diese konditionalen Knock Out-Organismen sind wichtige biologische Modelle, mittels derer viele Fragestellungen zum Beispiel der Neurobiologie oder Entwicklungsbiologie untersucht werden können. Des weiteren dienen sie als Modellsysteme für Krankheiten. Ein Schwerpunkt bilden hier neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer, die amyotrophische laterale Sklerose, Prionen-Krankheiten,

die Huntington-Krankheit, die spinocerebellare Ataxien und Parkinson-Krankheit. Alle Fortschritte zur Aufklärung der Krankheitsursache und des –verlaufs wurden im wesentlichen durch Maus-Modelle dieser genetisch bedingten humanen Erkrankungen des Nervensystems erzielt. Regulierbare eukaryontische Genexpressionssysteme bieten aber auch in der Gentherapie vielversprechende Einsatzmöglichkeiten.

2.6.1 Kontrolle der Gedächtnisbildung durch die regulierte Expression eines CAMK II-Transgens

Die Frage, was genau im Gehirn beim Lernen passiert und woraus Erinnerungen bestehen, untersuchen Wissenschaftler schon seit Jahrzehnten. Zu der grundlegenden Frage, wie das Gehirn Gedächtnisinhalte speichert und repräsentiert, veröffentlichte der kanadische Psychologe D. O. Hebb bereits 1949 eine Idee: Eine Gedächtnisspur entstehe, wenn zwei verknüpfte Neuronen gleichzeitig aktiv seien – dadurch festige sich ihr Kontakt, was den Informationsfluss zwischen beiden Zellen erleichtere (Hebb, 1949). Im Jahre 1973 entdeckten Forscher an der Universität Oslo ein Verhalten der Neuronen, das in den Kernpunkten Hebb's Theorie entsprach. Sie stimulierten Nervenzellen des Hippocampus mit einer Serie hochfrequenter elektrischer Impulse. Daraufhin stieg die Übertragungsfähigkeit der Schaltstellen und blieb über Stunden, Tage oder sogar Wochen erhöht. Das Phänomen erhielt den Namen Langzeitpotenzierung (LTP). Der Hippocampus trägt also maßgeblich zur Gedächtnisbildung bei. Spätere Studien zeigten, dass eine niederfrequente Stimulierung derselben Neuronen im Hippocampus dagegen die Übertragungsstärke verringerte. Auch dieser Prozess besteht längerfristig und wird daher Langzeitunterdrückung (LTD) genannt. LTP- und LTD gelten mittlerweile als Hauptmechanismen für das Speichern und Löschen im Gehirn. Um die LTP und LTD auszulösen, bedarf es der Aktivierung so genannter N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren in der Zellmembran der Empfängerneuronen. Diese kontrollieren den Einstrom von Calcium-Ionen in die Nervenzelle, welche eine Signalkaskade aktivieren, die die Intensität der synaptischen Verbindung stärkt. Zum Öffnen benötigt der Kanal zwei getrennte Signale gleichzeitig: die Bindung des Neurotransmitters Glutamat, ausgeschüttet von der vorgeschalteten Nervenzelle, sowie eine elektrische Spannungsänderung an der Zellmembran, eine Depolarisation, ausgelöst durch ein weiteres Neuron. Der Botenstoff signalisiert dem Kanal eine Aktivität der vorgeschalteten Zelle, die Depolarisation hingegen eine gleichzeitige Erregung der eigenen Zelle. Somit können die Rezeptoren zwei zeitlich zusammentreffende Ereignisse miteinander verknüpfen, eine Voraussetzung für die Gedächtnisbildung. Erst mit der Erzeugung transgener Mäuse in den letzten zehn Jahren kann man die molekularen Grundlagen der beteiligten Prozesse verstehen.

NMDA-Rezeptoren bestehen aus vier Protein-Untereinheiten: einer NR1-Untereinheit, die in allen NMDA-Rezeptoren vertreten ist, in Kombination mit den Untereinheiten NR2A, NR2B, NR2C oder NR2D (Gingrich und Roeder, 1998).

Gewöhnliche Knock-Out Mäuse, bei denen die Gene für die verschiedenen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors im gesamten Organismus ausgeschaltet sind, sterben vor oder kurz nach der Geburt, da sie sich infolge des jeweils fehlenden Gens nicht normal entwickeln. Infolgedessen generierte man induzierbare, neuronspezifische Systeme, die das Problem der neonatalen Lethalität umgehen und die Untersuchungen zur Gedächtnisbildung am adulten Tier ermöglichen.

Hierzu verwendete man das TET-Off System unter der Kontrolle des neuronspezifischen α -Calcium-Calmodulin-abhängigen Kinase II (CAMKII α) -Promotors. CAMKII α ist eine Serin-Threonin-Proteinkinase, die postnatal in Neuronen des Neocortex, Hippocampus, der Amygdala und den basalen Ganglien exprimiert wird (Mayford, 1996).

Der Tetrazyklin-Transaktivator (tTA) wurde unter die Kontrolle des CAMKII α -Promotors gestellt, so dass dieser nur in den aufgeführten Gehirnregionen exprimiert wurde. Die zu exprimierenden Zielgene (beispielsweise die unterschiedlichen NMDA-Rezeptor Typen oder Gene, die an der Signalweiterleitung nach Calcium-Einstrom in die Nervenzelle beteiligt sind und ebenfalls an der LTP mitwirken) wurden in ein Plasmid stomabwärts eines minimalen Promotors mit TRE-Bindestelle kloniert. Nach Erzeugung transgener Mäuse mit diesen Plasmiden, wurde die Expression der Zielgene in Neuronen der spezifischen Gehirnregionen über die Gabe von Tetra- oder Doxyzyklin reguliert. Mit diesem räumlich und zeitlich regulierbaren System konnten wichtige molekulare Mechanismen der synaptischen Plastizität untersucht werden. Beispielsweise führt das Abschalten der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors in den Pyramidenzellen des Hippocampus zu einem Verlust des räumlichen Gedächtnis, wohingegen das nichträumliche Lernen unbeeinflusst blieb. So konnten die NMDA-Rezeptoren als molekulare Hauptschalter für verschiedenartige Lern- und Gedächtnisprozesse identifiziert werden (Tsien, 2000).

2.7 Die Struktur des Gens 83.5

Zur Identifizierung spezifischer Proteine der Hirnkapillarendothelzellen, derjenige Zelltyp der die anatomische Grundlage der Blut-Hirn-Schranke (BHS) bildet, wurde in unserem Arbeitskreis der molekularbiologische Ansatz der subtraktiven Klonierung verwendet (Weiler-Güttler, 1998). Mit diesem Verfahren wurde eine cDNA-Bank angelegt, die mit mRNA-Molekülen angereicht war, die für BHS-spezifische Proteine codieren. Aus dieser cDNA-Bank wurde ein 400 Nukleotide langer cDNA-Klon mit der Bezeichnung Klon 83.5 isoliert, der keine signifikanten Sequenzhomologien zu bereits bekannten Nukleinsäuresequenzen aufwies (Zinke, 1992). Dieser cDNA-Klon 83.5 war die Grundlage zu weiteren Arbeiten, die schließlich zur vollständigen Sequenz- und Strukturaufklärung des Gens 83.5 sowie der aus ihm entstehenden mRNA-Moleküle beziehungsweise Proteine und deren zelluläre Lokalisation führten. Im Folgenden werden die erhaltenen Strukturdaten der Untersuchungen zusammenfassend beschrieben.

Das Gen 83.5 stellt ein single-copy Gen dar, d.h. es liegt innerhalb des haploiden Schweinegenoms in einer einzigen Kopie vor, und hat eine Länge von 21.746 bp (Bangsow, 1996). Ausgehend von dem Gen 83.5 werden zwei mRNAs gebildet, die in der vorliegenden Arbeit als *tmp* 83.5 (transmembrane protein) und *sp* 83.5 (soluble protein) bezeichnet werden. Die mRNA *tmp* 83.5 hat eine Gesamtlänge von 2.674 nt (Perl, 1996), der ermittelte offene Leserahmen (ORF) erstreckt sich von dem Translationsstartcodon an Position 588 bis zu dem Translationsstoppcodon an Position 1.016. Daraus ergibt sich eine 587 nt lange 5'-nichttranslatierte (5'-UTR) und eine 1.658 nt lange 3'-nichttranslatierte Region (3'-UTR). Die aus dem offenen Leserahmen abgeleitete Aminosäuresequenz führte zu einem 142 Aminosäuren langen Protein mit einer molaren Masse von 15,8 kDa. Hydrophobizitäts- sowie Sekundärstrukturanalysen der Aminosäuresequenz zeigten, dass die mRNA *tmp* 83.5 für ein Transmembranprotein (TMP 83.5) codiert. Die Analysen ergaben eine 30 Aminosäuren lange N-terminale extrazelluläre Domäne (Position 588 bis 677 in der mRNA-Sequenz), gefolgt von einem 23 Aminosäuren langen α -helikalen Transmembrananker (Position 678 bis 749 in der mRNA-Sequenz) und einer 87 Aminosäuren langen C-terminalen cytoplasmatischen Domäne (Position 750 bis 1.016 in der mRNA-Sequenz). Die durchgeführten Datenabgleiche weisen daraufhin, dass es sich bei dem TMP 83.5 um ein noch nicht charakterisiertes Transmembranprotein handelt, das zu einer bisher nicht beschriebenen Rezeptorproteinklasse gehört oder eine Untereinheit größerer Rezeptorkomplexe im Säugetiergehirn darstellt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Identifizierung potenzieller Glycosylierungs- und Phosphorylierungsstellen am N-Terminus, die möglicherweise an Ligandenbindungen und Signalweiterleitung beteiligt sind.

Die mRNA *sp* 83.5 hat eine Gesamtlänge von 2.374 nt (wurde in der vorliegenden Arbeit bestimmt, Abb. 15). Der ermittelte offene Leserahmen erstreckt sich von Position 596 bis 733. Daraus ergibt sich ein 46 Aminosäuren langes Protein (SP 83.5) mit einer molaren Masse von 5,4 kDa. Die 5'-UTR umfasst 596 nt und die 3'-UTR 1.641 nt. Das Translationsinitiations-Codon der mRNA *tmp* 83.5 ist in der mRNA *sp* 83.5 nicht enthalten, was zu einem verkürzten Protein (SP 83.5) ohne extrazelluläre und Transmembran-Domäne führt (Abb. 15). Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist identisch mit dem C-Terminus des TMP 83.5, so dass SP 83.5 die cytoplasmatische Isoform des Proteins TMP 83.5 darstellt.

Durch Vergleich der Nukleinsäuresequenzen der mRNA *tmp* 83.5 und mRNA *sp* 83.5 mit der genomischen Sequenz des Gens 83.5 konnte die Exon/Intron Verteilung und somit die vollständige Genstruktur bestimmt werden (Bangsow, 1996). Die Lage der Exons und Introns im Gen 83.5 und ihre Größen sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Die Bildung der mRNAs ist in Abbildung 15 schematisch dargestellt.

Tab. 2.4: Größe und Lage der Exon- und Intronbereiche beider mRNAs im Gen 83.5

Exon-Nr.	Exon-Größe	Position	Intron-Nr.	Intron-Größe
1	590	4.607 – 5.196	1	3.515
2	36	8.711 – 8.747	2	5.377
3	36	14.124 – 14.160	2a	5.025
3a	382	13.778 – 14.160	3	1.589
4	120	15.750 – 15.869	4	1.991
5	57	17.861 – 17.917	5	1.931
6	1.816	19.848 – 21.664		

Die beiden mRNAs haben einen identischen Sequenzbereich von 2.028 bp, unterscheiden sich aber am 5'-Ende, das bei mRNA *tmp* 83.5 626 nt und bei mRNA *sp* 83.5 304 nt umfasst. Die Zuordnung der mRNA-Sequenzen zur Gensequenz ergab, dass die individuelle Sequenz im 5'-Bereich der mRNA *sp* 83.5 Teil des zweiten Introns ist. Die beiden Transkripte sind demnach nicht das Produkt alternativen Spleißens, sondern werden von zwei Transkriptionsstartpunkten aus gebildet und stehen somit unter der Transkriptionskontrolle verschiedener Promotoren. Das Protein SP 83.5 stellt die erste beschriebene lösliche Isoform eines Transmembranproteins dar, das durch alternative Promotoren erzeugt wird. Der Startpunkt der Transkription für die mRNA *tmp* 83.5 befindet sich im Gen 83.5 an Position 4.607/4.608 (Perl, 1996, siehe Anhang 7). In der vorliegenden Arbeit sollte zusätzlich der Transkriptionsstartpunkt der mRNA *sp* 83.5 bestimmt werden.

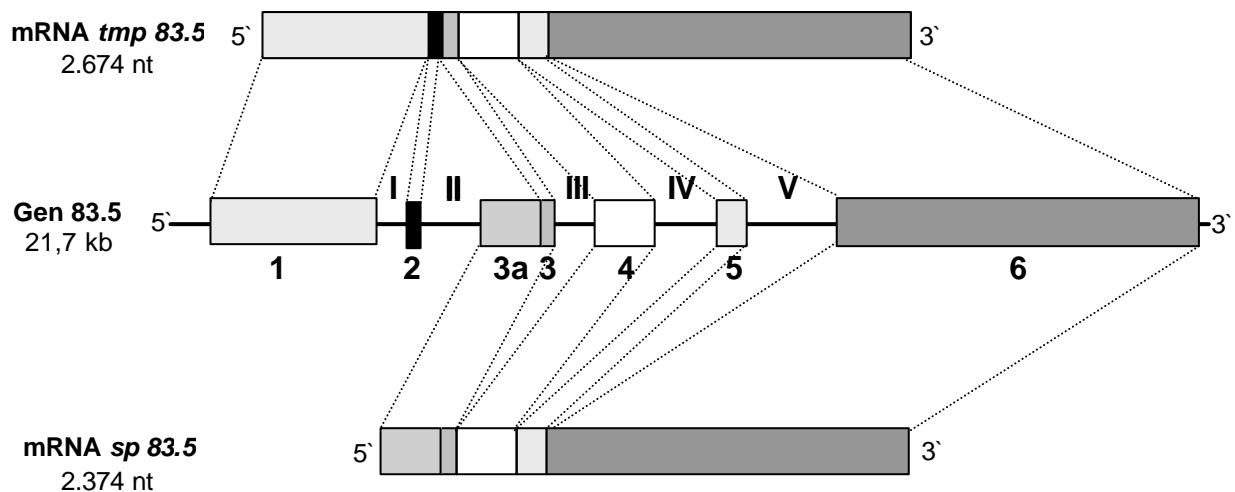


Abb. 15: Bildung der mRNAs *tmp* und *sp* 83.5 aus dem Gen 83.5 (Bangsow et al., 1998)

Dargestellt ist die Exon/Intron Verteilung im Gen 83.5 und die Zuordnung zur mRNA *tmp* 83.5 und mRNA *sp* 83.5. Das Gen 83.5 besteht aus 6 Exons und 5 Introns (römische Ziffern). Ausgehend von dem Gen 83.5 wird die mRNA *tmp* 83.5 aus den 6 Exons gebildet. Die ersten beiden bilden die individuelle 5'-Region und codieren für die extrazelluläre und Transmembran-Domäne des Proteins. Die mRNA *sp* 83.5 wird aus vier Exons gebildet. Das erste Exon ist das um 346 bp verlängerte Exon 3 und bildet das individuelle 5'-Ende dieser mRNA. Die Exons 1 und 2 sind in der mRNA *sp* 83.5 nicht enthalten, so dass dieses Transkript für ein lösliches Protein codiert.

Untersuchungen zur Gewebeverteilung der beiden mRNAs mittels RT-PCR- und Northern-Blot Analysen zeigten, dass beide gehirnspezifisch exprimiert werden (Schepelmann, 1996). Mittels *in situ* Hybridisierungen an Gewebeschnitten des Schweinegehirns konnte gezeigt werden, dass der zelluläre Bildungsort der mRNA *tmp* und *sp* 83.5 verschiedene Neuronentypen in der Groß- und Kleinhirnrinde sind (Oberthür, 2002). Bestätigt wurde der neuronale Ursprung durch immunhistochemische Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern gegen die gemeinsame cytoplasmatische Domäne der Proteine (May, 1999). Darüber hinaus konnte die Expression der Proteine TMP und SP 83.5 korrespondierend zu ihrer Größe in Western-Blot Analysen mit Zellextrakten des Schweinegehirns nachgewiesen werden (May, 1999 und Oberthür, 2002).

Die neuronale Expression des Gens 83.5 zeigt sich auch in der Struktur der Exons 2 und 3, die lediglich eine Länge von 36 bp aufweisen. Interne Exons höherer Vertebraten haben normalerweise eine minimale Größe von 50 bp damit sie vom Spleißapparat erkannt werden. Ausnahmen bilden sogenannte Mini-Exons in neuronalen Genen, die trotz der geringen Größe von dem Spleißapparat der Neuronen korrekt prozessiert werden (Bangsow et al., 1998).

Eine funktionelle Einordnung der Proteine TMP 83.5 und SP 83.5 ist nach den bisher erzielten Ergebnissen nicht möglich, da keine Sequenzhomologien in der Aminosäuresequenz zu bereits charakterisierten Proteinen mit bekannter Funktion existieren.

2.8 Zielsetzung und Strategie der Untersuchungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Mechanismen der Genregulation aufzuklären, die zu einer neuronalen Transkription der mRNA *tmp* 83.5 führen und den Transkriptionsstartpunkt des Promotors *sp* 83.5 zu ermitteln.

Ausgehend von dem single-copy Gen 83.5 werden zwei ausschließlich im Gehirn transkribierte mRNA-Moleküle gebildet (Bangsow et al., 1998). Die mRNA-Sequenzen codieren für ein potenzielles Transmembranprotein TMP 83.5 sowie dessen cytoplasmatische Isoform SP 83.5. Der zelluläre Bildungsort beider Transkripte sind verschiedene Neuronentypen. Die Korrelation der genomischen Sequenz mit den mRNA-Sequenzen zeigte, dass diese beiden mRNAs nicht das Produkt alternativen Spleißens eines gemeinsamen Primärtranskriptes sind, sondern ausgehend von zwei Transkriptionsstartpunkten gebildet werden und somit unter der Kontrolle verschiedener Promotoren des Gens 83.5 stehen (Bangsow, 1996). Der Transkriptionsstartpunkt, von dem aus die mRNA-Synthese beginnt und der den Übergang von Promotor zu Strukturgen kennzeichnet, wurde für die mRNA *tmp* 83.5 bereits bestimmt (Perl, 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst nach dem Verfahren der *Primer Extension* der Transkriptionsstartpunkt der mRNA *sp* 83.5 und somit der Übergang von Promotor zu Strukturgen ermittelt werden. Computergestützte Analysen der Promotorregion *sp* 83.5 sollten dann erste Einblicke potenzieller DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren liefern.

Der sich daran anschließende Teil der Arbeit hatte zum Ziel, funktionelle Sequenzelemente der Transkription des 4.607 bp langen Promotors *tmp* 83.5, die für eine korrekte räumliche Transkription des Gens 83.5 verantwortlich sind und zur Bildung der mRNA *tmp* 83.5 führen, zu identifizieren. Diese Untersuchungen sind besonders interessant, denn bis heute sind nur für wenige Gene die molekularen Grundlagen der neuronalen Transkriptionskontrolle beschrieben.

Die funktionellen Promotorbereiche sollten zunächst durch Gen-Transfer-Experimente (Transfektionen) in neuronale Säugerszelllinien mit sogenannten Promotortestplasmiden identifiziert werden. Zur Auffindung zellspezifisch wirkender Promotorelemente sollten die Promotortestplasmide parallel hierzu in nichtneuronale Säugerszellen transfiziert werden. Zu diesem Zweck war beabsichtigt eine Serie von Promotortestplasmiden, deren Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des Wildtyp-Promotors sowie zunehmenden 5'-Deletionen des Wildtyp-Promotors stehen, zu generieren. Der Einfluss dieser Promotorveränderungen auf die Expression des Reportergens ist ein Maß für die

Funktionalität des von der Veränderung betroffenen Promotorbereichs und ermöglicht funktionelle DNA-Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren einzugrenzen.

Neben der beschriebenen Identifizierung funktioneller Promotorbereiche des kompletten Promotors *tmp 83.5* sollten durch *in vitro*-Methoden die spezifischen DNA-Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren im 300 bp langen Kern- und proximalen Promotor ermittelt werden. Zu einem solchen Nachweis sollten zunächst DNase I Footprinting Experimente mit DNA-Fragmenten des Promotorbereichs, die eine basengenaue Bestimmung von Proteinbindungsstellen innerhalb eines langen DNA-Fragmentes ermöglichen, durchgeführt werden. Die DNA-Bindungsstellen sollten anschließend in Band-Shift-Analysen belegt und die Spezifität der Bindung durch Kompetitionsstudien nachgewiesen werden. Computergestützte Analysen der identifizierten Sequenzelemente sollten darüber hinaus zeigen, welche bekannten Transkriptionsfaktoren an der Transkriptionskontrolle der mRNA *tmp 83.5* beteiligt sind.

Die erhaltenen Ergebnisse sollten zu einem Modell der Transkriptionsregulation des Gens 83.5 führen, das die beobachtete neuronale Expression molekularbiologisch erklärt.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Amberlite MB-1	Biomol, Ilvesheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Borsäure	Serva, Heidelberg
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-gal)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Fluka, Neu-Ulm
Caseinhydrolysat	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
Dimethyldichlorsilan (Repel-Silan)	LKB, Freiburg
Dimethyldioctadecylammoniumbromid (DDAB)	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Gibco BRL, Eggenstein
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
EDTA, Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
EGTA, Dinatriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Entwickler für Röntgenfilme	DuPont, Neu-Isenburg
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ficoll-400	Serva, Heidelberg
Fixierer für Röntgenfilme	DuPont, Neu-Isenburg
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
D(+)-Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Biomol, Ilvesheim
Guanidiniumthiocyanat	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Sigma, Deisenhofen
Heringssperma-DNA	Boehringer, Mannheim
Hexamincobalttrichlorid	Fluka, Neu-Ulm
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol, Ilvesheim
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Large DNA Low Melt Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Mangan(II)chlorid	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Fluka, Neu-Ulm
Methacrylsäure-3-trimethoxysilylpropylester (Bindesilan)	LKB, Gräfelfing
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg

3-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS)	Fluka, Neu-Ulm
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natrium-N-laurylsarkosin	Roth, Karlsruhe
N-(3-Aminopropyl)-1,4-diamino-butan (Spermidin)	Sigma, Deisenhofen
N,N'-Bis-(3-aminopropyl)-1,4-diamino-butan (Spermin)	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
L- α -Phosphatidylcholin	Sigma, Deisenhofen
Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Fluka, Neu-Ulm
Polyethylenglycol 4000 bzw. 6000 (PEG)	Merck, Darmstadt
Polyvinylpyrrolidon	Sigma, Deisenhofen
Sephadex G-25, G-50, G-100	Pharmacia, Freiburg
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Neu-Ulm
Xylencyanol FF	Fluka, Neu-Ulm
Allgemeine Laborchemikalien und Lösungsmittel in p.a.-Qualität	Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Fluka, Neu-Ulm Sigma, Deisenhofen

3.1.2 Spezielle Materialien und Geräte

Centricon 3 und 10	Amicon, Witten
Dialyseschlauch	Bio-Rad, München
DNA-Sequenzierapparatur Makrophor	LKB, Gräfelfingen
Exponierbox mit Verstärkerfolie	Kodak, Rochester, USA
Filterpapier 3MM	Whatman, England
Filtrationsanlage	Millipore, Eching
Geltrockner	LKB, Gräfelfingen
Glashomogenisator	Braun, Melsungen
Homogenisator (Ultra Turrax)	Janke und Kunkel, Staufen
Kippschüttler	Desaga, Heidelberg
Laborzentrifuge Sepatech	Heraeus, Hanau
Membranfilter RC 58, 0,2 μ m	Schleicher&Schüll
Mikroliter Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Polaroid Sofortbild-Film 667	Polaroid, Offenbach
Qiagen tip-100 Säulen	Qiagen, Düsseldorf
Quarzküvetten	Hellma, Frankfurt
Zentrifugen und Rotoren	Sorvall, Neu-Isenburg
Röntgenfilme	Beckman, München
Röntgenfilmkassette mit Verstärkerfolie	Kodak, Rochester, USA
Sofortbildkamera	Kodak, Rochester, USA
Spannungsgeräte	Polaroid, Offenbach
Spektralphotometer	LKB, Gräfelfingen
Sterilwerkbank	Beckman, Dreieich
Szintillationszähler Minaxi β Tri Carb 4000	Nunc, Wiesbaden
	Packard, Frankfurt

Thermocycler	LKB, Gräfelfingen
Mikroliter Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Ultrazentrifugen	Beckman, München
UV-Transilluminator	Vetter, Karlsruhe
Vakuumzentrifuge Speed- Vac Univapo 150 H	Univapo, Frankfurt
Vortex-Mischer	Janke und Kunkel, Staufen
Wasserbadschüttler	Scientific Co., USA
Whatman 3MM Papier	Whatman, England

3.1.3 Zellkulturmaterialien

Brutschrank mit CO ₂ -Begasung	Heraeus, Osterode
Gewebekulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ²	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturplatten 6-Loch, 12-Loch, 24-Loch	Greiner, Nürtingen
Kryoröhrchen	Greiner, Nürtingen
Lichtmikroskop	Nikon, Japan
Sterilbank	Heraeus, Osterode
Neubauer-Zählkammer (0,1 mm x 0,0025 mm ²)	Neubauer
Zellschaber	Greiner, Nürtingen

3.1.4 Enzyme und Proteine

β-Agarase I	New England Biolabs, USA
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	Boehringer, Mannheim
DNase I aus Rinderpankreas	Boehringer, Mannheim
DNA-Polymerase aus <i>E. coli</i> (Klenow-Fragment)	Boehringer, Mannheim
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Madison
Exonuklease III	Pharmacia, Freiburg
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma, Deisenhofen
M-MLV Reverse Transkriptase	Gibco BRL, Eggenstein
Nerve-Growth-Faktor (NGF 2.5S, Maus)	Gibco BRL, Eggenstein
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Pwo DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Rekombinante Luciferase	Promega, Madison
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
RNase A	Boehringer, Mannheim
S1-Nuklease	Pharmacia, Freiburg
Superscript TM Reverse Transkriptase	Gibco BRL, Eggenstein
Taq-Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs, USA
T4 DNA Ligase	Pharmacia, Freiburg
T7 DNA Polymerase	Pharmacia, Freiburg
T7 Sequencing TM Kit	Pharmacia, Freiburg
Restriktionsendonukleasen Typ II	AGS, Heidelberg
	New England Biolabs, USA
	Gibco BRL, Eggenstein
	Pharmacia, Freiburg

3.1.5 Nukleotide und DNA

Desoxynukleotide	Roth, Karlsruhe
Heringssperma DNA	Boehringer, Mannheim
Poly (dI-dC)	Boehringer, Mannheim
Poly (dA-dT)	Sigma, Deisenhofen
tRNA	Sigma, Deisenhofen

Radioaktive Nukleotide:

α - ³² P-dATP (6000 Ci/mmol; 10 Ci/l)	Du Pont NEN, Neu-Isenburg
α - ³² P-dCTP (6000 Ci/mmol; 10 Ci/l)	Du Pont NEN, Neu-Isenburg
α - ³⁵ S-dATP (1250 Ci/mmol; 12,5 Ci/l)	Du Pont NEN, Neu-Isenburg
γ - ³² P-ATP (6000 Ci/mmol, 10 Ci/l)	Du Pont NEN, Neu-Isenburg

3.1.6 Nährmedien

LB-Medium	10 g/l	Caseinhydrolysat
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
		pH 7,5 mit 10 N NaOH einstellen
LB-Amp-Medium	LB-Medium nach dem Autoklavieren unter 55 °C abkühlen lassen und auf 100 mg/l Ampicillin mit einer 100 mg/ml Stammlösung einstellen.	
LB-Amp-Agar	Zugabe von 15 g Agar zu LB-Medium, Autoklavieren und nach Abkühlung unter 55 °C auf 100 mg/l Ampicillin (s.o.) einstellen.	
SOC-Medium	20 g/l	Caseinhydrolysat
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	nach dem Autoklavieren folgende Substanzen auf angegebene Endkonzentration steril zugeben:	
	20 mM	Glucose
	10 mM	MgSO ₄
	10 mM	MgCl ₂
SOB-Medium	20 g/l	Caseinhydrolysat
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	nach dem Autoklavieren folgende Substanzen auf angegebene Endkonzentration steril zugeben:	
	10 mM	MgSO ₄
	10 mM	MgCl ₂

3.1.7 Lösungen und Puffer

10 x MOPS/EDTA Puffer:	200	mM	MOPS
	50	mM	Natriumacetat
	10	mM	EDTA
			mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
50 x TAE Puffer:	2	M	Tris-Base
	1	M	Essigsäure
	0,1	M	EDTA
			gegebenenfalls mit Eisessig pH 8,3 einstellen
5 x DNA-Auftragspuffer:	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau
	50	% (v/v)	Glycerin
	0,2	% (w/v)	SDS
			in 1 x TAE Puffer
10 x TBE Puffer:	1	M	Tris
	830	mM	Borsäure
	10	mM	EDTA
			pH 8,3 ohne weitere pH-Wert Einstellung
5 x Tris-Glycin Puffer:	250	mM	Tris
	1,9	M	Glycin
	10	mM	EDTA
			mit Eisessig auf pH 8,5 einstellen
TE-Puffer:	10	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	1	mM	EDTA, pH 8,0

3.1.8 Zellkulturmedien und Supplemente

Dispase (2,4 U/ml)	Boehringer, Mannheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Eggenstein
DMSO	Fluka, Neu-Ulm
Fötales Kälberserum	Gibco, Eggenstein
FuGENE TM 6 Transfection Reagent	Boehringer, Mannheim
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
L- Glutamin (200 mM)	Gibco, Eggenstein
LipofectAMINE TM Transfection Reagent	Gibco, Eggenstein
LipofectAMINE PLUS TM Transfection Reagent	Gibco, Eggenstein
Minimal Essential Medium (MEM)	Gibco, Eggenstein
Natriumbicarbonat	Gibco, Eggenstein
Natriumpyruvat	Gibco, Eggenstein
NGF 2.5S Maus	Gibco, Eggenstein
Penicillin (50.000 U/ml)/Streptomycin (50 mg/ml)	Boehringer, Mannheim
Pferdeserum, hitzeinaktiviert	Gibco, Eggenstein
L- α -Phosphatidylcholin Typ II, Sojabohnen	Sigma, Deisenhofen

Rattenschwanzkollagen Typ I	Sigma, Deisenhofen
10 x Trypsin (0,5 % (w/v))/EDTA (0,2 % (w/v))	Gibco, Eggenstein
SuperFect Transfection Reagent	Qiagen, Düsseldorf

3.1.9 Puffer, Lösungen und Mediensupplemente für die Zellkultur

PBS:	140 mM NaCl
	3 mM KCl
	8 mM Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
Trypsin/EDTA-Lösung:	Die 10fach konzentrierte Stammlösung (3.1.8) mit PBS 1:10 verdünnen, und in Portionen zu 10 ml bei –20 °C lagern.
Dispase (2,4 U/ml):	Als gebrauchsfertige Lösung bezogen, in Portionen zu 10 ml bei –20 °C lagern.
Penicillin/Streptomycin: (1.000 U/ml, 10 µg/ml Streptomycin)	Nach Herstellerangaben aus Lyophilisat herstellen, in Portionen zu 2 ml bei –20 °C lagern.
1 % Gelatinelösung:	1 % (w/v) Gelatine in Milli-Q-Wasser autoklavieren und bei RT lagern.

3.1.10 DNA-Größenstandard

SPPI/EcoR I Größenstandard

Banden-Nr.	Größe (kb)	Banden-Nr.	Größe (kb)
1	7,98	9	1,48
2	7,08	10	1,36
3	5,96	11	1,10
4	4,77	12	0,89
5	3,43	13	0,68
6	2,73	14	0,48
7	1,93	15	0,36
8	1,83		

λ-DNA/EcoR I/Hind III Größenstandard

(Molecular weight marker III, Boehringer Mannheim Roche)

Banden-Nr.	Größe (bp)	Banden-Nr.	Größe (bp)
1	21.226	7	1.904
2	5.148	8	1.584
3	4.973	9	1.375
4	4.268	10	947
5	3.530	11	831
6	2.027	12	564

1 kb DNA Leiter

(New England Biolabs)

Banden-Nr.	Größe (kb)	Banden-Nr.	Größe (kb)
1	10	6	3
2	8	7	2
3	6	8	1,5
4	5	9	1
5	4	10	0,5

100 bp DNA Leiter

(New England Biolabs)

Banden-Nr.	Größe (kb)	Banden-Nr.	Größe (kb)
1	1,5	7	0,6
2	1,2	8	0,5
3	1,0	9	0,4
4	0,9	10	0,3
5	0,8	11	0,2
6	0,7	12	0,1

3.1.11 Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue

Stratagene, Heidelberg

Genotyp:

*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F⁺proAB, lacI^q, ΔM15, Tn10(tet^r)]**E. coli* DH5α

Stratagene, Heidelberg

Genotyp:

*F⁻, supE44, ΔlacU169, hsdR17, φ80lacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1**E. coli* JM109

Promega, Madison

Genotyp:

F⁺traD36, lacI^q, ΔlacZM15, proA⁺B⁺/e14⁻(McrA⁻), Δlac-proAB, thi-1, gyrA96, endA1, hsdR17, relA1, supE44, recA1

3.1.12 Plasmidvektoren

3.1.12.1 pBluescript II SK(-) (Stratagene, Heidelberg)

Das Plasmid pBluescript II SK(-) ist ein pUC19-Derivat mit einer Größe von 2.961 bp und diente als Vektor zur Klonierung von DNA-Fragmenten bis zu 10 kb Größe.

Dieses Plasmid enthält ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion transformierter Bakterien. Das in ihm enthaltene lacZ-Gen codiert für das aminoterminale Ende der β -Galaktosidase. Die Expression des lacZ-Gens kann durch IPTG induziert werden, wodurch in geeigneten Wirtsorganismen (z.B. *E. coli* XL1-Blue) durch α -Komplementation aktive β -Galaktosidase gebildet wird. Durch Ausplattieren auf Nährmedien, die das chromogene Substrat X-gal enthalten, entstehen blaue Kolonien. Insetiert man DNA-Fragmente in die Polylinkerregion, innerhalb des lacZ-Gens, kann keine β -Galaktosidase gebildet werden, die entsprechenden Kolonien sind weiß. Dieser Blau-Weiß-Test ermöglicht die optische Erkennung von Kolonien, die rekombinante Plasmide besitzen. Des weiteren enthält das Plasmid einen Replikationsursprung für die einzelsträngige (f1(-) origin), als auch für die doppelsträngige DNA-Synthese (ColE1 origin).

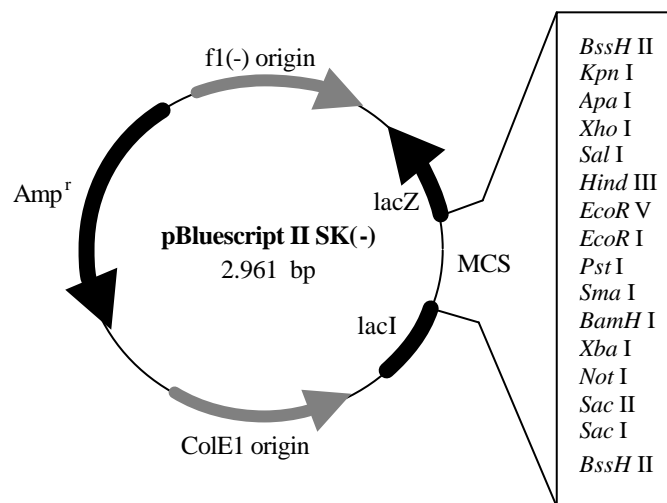


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Vektors pBluescript II SK(-)

Amp^r: Ampicillinresistenzgen, ColE1 origin: Replikationsursprung für die doppelsträngige DNA-Synthese, lacZ: β -Galactosidase-Gen, f1 (-) origin: Replikationsursprung des Bakteriophagen f1 für die einzelsträngige DNA-Synthese, MCS: Polylinkerregion (Multiple Cloning Site), enthält singuläre Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen.

3.1.12.2 pGL3-Basic Luciferase Reportervektor (Promega, Madison)

Das Plasmid pGL3-Basic diente als Vektor zur Herstellung von Promotortestplasmiden. Dieser Reporter-Vektor enthält das Luciferase-Gen (luc+), das für das Enzym Luciferase des nordamerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* codiert. Aufgrund fehlender

eukaryontischer Promotor- und Enhancersequenzen eignet er sich zur Untersuchung von Promotoren.

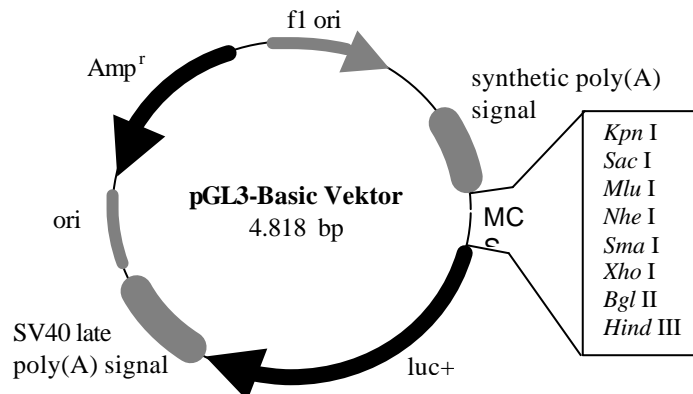


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des pGL3-Basic Luciferase Reporter Vektors

luc+: Luciferase-Gen, Amp^r: Ampicillinresistenzgen, f1 ori: Replikationsursprung für die einzelsträngige DNA-Synthese, ori: Replikationsursprung für die doppelsträngige DNA-Synthese, MCS: Polylinkerregion (multiple cloning site), SV40 late poly(A) signal: Polyadenylierungssignal des SV40, synthetic poly(A) signal: Polyadenylierungssignal, terminiert die Transkription, die durch den Vektor initiiert wird.

3.1.12.3 pRL-TK Luciferase Kontrollvektor (Promega, Madison)

Der pRL-TK Vektor wurde als interne Kontrolle für Transfektionen von Säugerzellen verwendet. Dessen Reportergen codiert für eine Luciferase des marinen Organismus *Renilla reniformis*. Das *Renilla* Luciferase-Gen steht unter der Kontrolle des Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK) Promotors, der zu einer mäßigen, konstitutiven Expression der *Renilla* Luciferase führt. Dieses Kontrollplasmid wurde mit den experimentellen Promotortestplasmiden in Säugerzellen cotransfiziert.

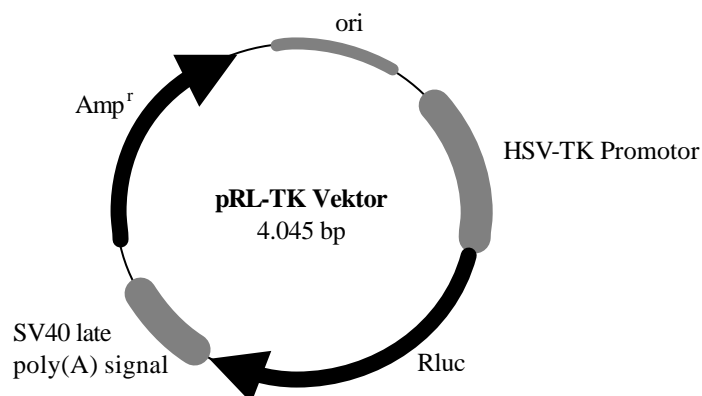


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des pRL-TK Reporter Vektors

Rluc: *Renilla* Luciferase-Gen, HSV-TK Promotor: Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase Promotor, Amp^r: Ampicillinresistenzgen, ori: Replikationsursprung für die doppelsträngige DNA-Synthese in *E. coli*, SV40 late poly(A) signal: Polyadenylierungssignal des SV40.

3.1.12.4 pGEM-T Vektor (Promega, Madison)

Das Plasmid pGEM-T diene als Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten. Der Vektor wurde vom Hersteller mit der Restriktionsendonuklease EcoR V linearisiert und mit einem 3'-terminalen Desoxythymidin an beiden Enden versehen. Diese einzelsträngigen 3'-Überhänge verhindern die Religation des Vektors und bilden kompatible überstehende Enden für PCR-Fragmente, die über bestimmte DNA-Polymerasen synthetisiert wurden. Diese DNA-Polymerasen, wie z.B. die *Taq*-Polymerase, fügen an das 3'-Ende des amplifizierten DNA-Fragmentes ein Desoxyadenosin an.

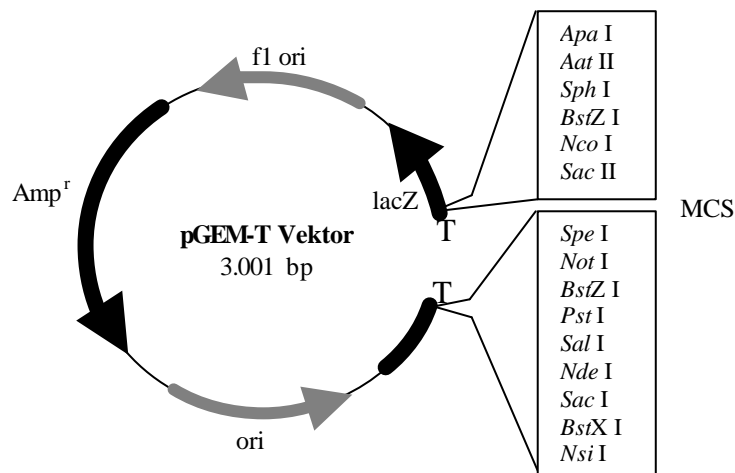


Abb. 3.4: Schematische Darstellung des pGEM-T Vektors

Amp^r: Ampicillinresistenzgen, f1 ori: Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1 für die einzelsträngige DNA-Synthese, ori: Replikationsursprung für die doppelsträngige DNA-Synthese, MCS: Polylinkerregion (Multiple Cloning Site), T: 3'-terminale Desoxythymidine, zur Insertion von PCR-Fragmenten mit 5'-terminalen Desoxyadenosinen.

3.1.12.5 pCMVb Vektor (Clontech, Palo Alto)

Der pCMVβ Reportervektor enthält das β-Galaktosidasegen unter der Kontrolle des humanen Cytomegalovirus Immediate Early Gene Promotors, der für eine starke Expression der β-Galaktosidase in Säugerzellen sorgt. Dieser Vektor diene zur Bestimmung der Transfektionseffizienz verschiedener Transfektionsreagenzien für Säugerzelllinien.

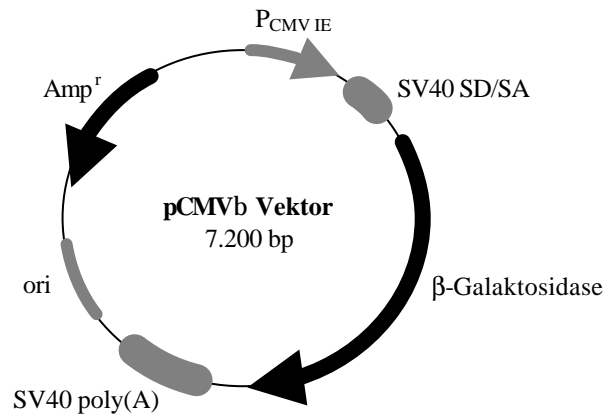


Abb. 3.5: Schematische Darstellung des pCMVb Vektors

β -Galaktosidase: β -Galaktosidase-Gen, Amp^r : Ampicillinresistenzgen, ori: Replikationsursprung für die doppelsträngige DNA-Synthese, SV40 poly(A): Polyadenylierungssignal des SV40, SV40 SD/SA: SV40 Spleißdonor und -akzeptor Sequenz, $P_{\text{CMV IE}}$: Promotor des Cytomegalovirus Immediate Early Gens.

3.1.13 Zelllinien

BHK 21	Hamsternierenfibroblasten, TU-Darmstadt, Institut für Biochemie, AK Biotechnologie Prof. Dr. Friedl, ECACC 85011433.
PC-12	Adrenale Phäochromocytomzellen der Ratte, die nach Induktion mit Nerve Growth Factor 2.5S zu sympathischen Neuronen differenzieren (Greene et al., 1976). Dr. M. Gassen, Merck KGaA, Darmstadt.
Neuro-2a	Gehirnneuroblastomazellen der Maus (Klebe und Ruddle, 1969). Dr. M. Gassen, Merck KGaA, Darmstadt.
SK-N-SH	Humane Gehirnneuroblastomazellen (Biedler et al., 1973). Dr. M. Gassen, Merck KGaA, Darmstadt.

3.1.14 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Herstellung kurzer doppelsträngiger DNA-Moleküle für Band-Shift-Analysen (3.2.17) und als Primer für die Sequenzierung (3.2.11) sowie Polymerasekettenreaktion (3.2.9) verwendet. Oligonukleotide wurden von Interactiva, Applied Biosystems, Gibco BRL und MWG Biotech bezogen.

3.1.14.1 Band-Shift-Oligonukleotide

Prolink +1 a (22mer): 5´-CATTCAAGGGCGTGCACTCTCC-3´
 Prolink +1 b (28mer): 5´-TCGAGGAGAGTGCACGCCCTTGAATGCA-3´

Hybridisierung zu:

Oligonukleotid A

5´-CATTCAAGGGCGTGCACTCTCC-3´
 3´-ACGTAAGTTCCCGCACGTGAGAGGAGCT-5´

Band-29/+6a (35mer): 5´-AAAATGTGCAAACAGAAGGAGGGTGAGGCTGCATT-3´
 Band-29/+6b (35mer): 5´-AATGCAGCCTCACCTCCTTCTGTTTGCACATTTT-3´

Hybridisierung zu:

Oligonukleotid B

5´-AAAATGTGCAAACAGAAGGAGGGTGAGGCTGCATT-3´
 3´-TTTTACACGTTTGTCTTCCTCCCACTCCGACGTAA-5´

Band-61/-28a (34mer): 5´-TAAGGCCCCCCTTGTCAATGCTTCCTCCACCAAA-3´
 Band-61/-28b (34mer): 5´-TTTGGTGGAGGAAGCATTGACAAGGGGGGCCTTA-3´

Hybridisierung zu:

Oligonukleotid C

5´-TAAGGCCCCCCTTGTCAATGCTTCCTCCACCAAA-3´
 3´-ATTCCGGGGGGAACAGTTACGAAGGAGGTGGTTT-5´

Band-95/-75 a (21mer): 5´-AAGCAACTTCCTAAAAGAGAG-3´
 Band-95/-75 b (21mer): 5´-CTCTCTTTTAGGAAGTTGCTT-3´

Hybridisierung zu:

Oligonukleotid D

5´-AAGCAACTTCCTAAAAGAGAG-3´
 3´-TTCGTTGAAGGATTTTCTCTC-5´

Band-128/-94 a (35mer): 5´-GCCCTAGAAAATGCAAAAAGTGAATAAATAAGGAA-3´
 Band-128/-94 b (35mer): 5´-TTCCTTATTTATTCACTTTTGCATTTTCTAGGGC-3´

Hybridisierung zu:

Oligonukleotid E

5´-GCCCTAGAAAATGCAAAAAGTGAATAAATAAGGAA-3´
3´-CGGGATCTTTTACGTTTTTCACTTATTTATTCCTT-5´

Band-162/-129 a (34mer): 5´-CCTAGCCTGGGAACCTCCATACGCTGCAGGTGCG-3´

Band-162/-129 b (34mer): 5´-CGCACCTGCAGCGTATGGAGGTTCCCAGGCTAGG-3´

Hybridisierung zu:

Oligonukleotid F

5´-CCTAGCCTGGGAACCTCCATACGCTGCAGGTGCG-3´
3´-GGATCGGACCCTTGGAGGTATGCGACGTCCACGC-5´

Band-183/-160 a (24mer): 5´-GGCTACAGCTCCAATTGGACCCCT-3´

Band-183/-160 b (24mer): 5´-AGGGGTCCAATTGGAGCTGTAGCC-3´

Hybridisierung zu:

Oligonukleotid G

5´-GGCTACAGCTCCAATTGGACCCCT-3´
3´-CCGATGTCGAGGTTAACCTGGGGA-5´

Band-208/-184 a (25mer): 5´-TCCTGTGGCTGTGGTGTAGGCCAGG-3´

Band-208/-184 b (25mer): 5´-CCTGGCCTACACCACAGCCACAGGA-3´

Hybridisierung zu:

Oligonukleotid H

5´-TCCTGTGGCTGTGGTGTAGGCCAGG-3´
3´-AGGACACCGACACCACATCCGGTCC-5´

Band-229/-207 a (23mer): 5´-GTTTCGATCCCTGGCCTCGCTTTC-3´

Band-229/-207 b (23mer): 5´-GAAAGCGAGGCCAGGGATCAGAC-3´

Hybridisierung zu:

Oligonukleotid I

5´-GTTTCGATCCCTGGCCTCGCTTTC-3´
3´-CAGACTAGGGACCGGAGCGAAAG-5´

Band-258/-230 a (29mer): 5´-GAACCCGACTAGGAACCATGAGGTTGTCA-3´

Band-258/-230 b (29mer): 5´-TGACAACCTCATGGTTCCTAGTCGGGTTC-3´

Hybridisierung zu:

Oligonukleotid J

5´-GAACCCGACTAGGAACCATGAGGTTGTCA-3´

3´-CTTGGGCTGATCCTTGGTACTCCAACAGT-5´

SP1 a (22mer): 5´-AGTCAGGAGGGCGGGGTAAgcc-3´

SP1 b (23mer): 5´-gccTTTACCCCGCCCTCCTGACT-3´

Hybridisierung zu:

SP1

5´-AGTCAGGAGGGCGGGGTAAgcc-3´

3´-TCAGTCCTCCCGCCCCATTtcgg-3´

3.1.14.2 PCR- und Sequenzier-Primer

Universalprimer

GL2 Primer 5´- CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA -3´

M13 Primer 5´- GTA AAA CGA CGG CCA GT -3´

RV3 Primer 5´- CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC-3´

SP6 Primer 5´-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT A-3´

T3 Primer 5´- ATT AAC CCT CAC TAA AG -3´

T7 Primer 5´- AAT ACG ACT CAC TAT AG -3´

Sequenzspezifische Primer

EK02: 5´-CTT AAA TGC CAT CTC CCA G-3´

EK03: 5´-ACG GAG CAG CTT GTC ACG-3´

Erb23: 5´- TTG GCG TGT GTC TTG C -3´

SB01: 5´- AGA AGG TCT CCT GTG TC -3´

SG01: 5´-CCC ACC AGA CAT CTT TAG-3´

SG02: 5´- GGG AGT GCA GAC CAA CAG -3´

SG03: 5´- ACA GAA CCT GCG TTG TAC -3´

SG04: 5´-GCC ATC CAA AAC TGA AGG-3´

SG05: 5´- GCT CCT TAA CTT CCT TGC -3´

SG06: 5´- GGA AGG GTT TGA GAA TCC -3´

SG07: 5´- GGT GGA GGA AGC ATT GAC -3´

SG08: 5´- GCT TGG TAT GTC GCA GAG -3´

SG09: 5´- ACA GCC ACA GCA AGG TGG -3´

SG10: 5´- GAA GTG AGG CTT AGT TGG C -3´

SG11: 5´- CTT GGA GGT GGG GGG TGC AG -3´

SG12: 5'- CTC TGT GTT GGA GGC ACG GC -3'
SG13: 5'- CAT TAC CTG TGT CGA TGT AG -3'
SM1: 5'-GTG ACA TTC ATA GAT GG-3`
SM2: 5'-CAC CAC GAT GGG GAC TC-3`
SM2b: 5'-GAT TGA ACC CGA AAC CT-3`
SM3: 5'-CAA GGG AGG AGG AGT TC-3`
SM4: 5'-ACG TGC CGC CTG AAG C-3`
SM5: 5'-CAT TCA TTC AGA CCT TG-3`
SM6: 5'-AAA GAG GAA GCG AAG AG-3`
SM7: 5'-AGG TTT GAG ATG GAG TC-3`
SM8: 5'-TCT GGT CAA ACT CAT AA-3`
SM9: 5'-AGA GAC AAA TAA GGA CC-3`
SM10: 5'-CCC CTG CCT GCT TTG TC-3`
SM11: 5'-GAG GCT GTG TGA TT-3`
SM12: 5'-TCT GCT CAT GAC TTC TG-3`
SM13: 5'-AGG GGT CGA ATA GGA GC-3`
SM14: 5'-AAC CAC TGC CCC ACG AC-3`
SM15: 5'-CGA ACT TGC ACC ACC AC-3`
SM16: 5'-CCC CTT TCC TGT CAC TG-3`
SP2 : 5'-GAC TAG GAA CCA TGA GG-3`

Prolink 4.330 I: 5'-CTA GCG AAA TGG GAT GCC-3`

Prolink 4.330 II: 5'-TTA GGC ATC CCA TTT CG-3`

Linker A: 5'-CTA GCT GAG CCT AAG GTC ATC-3`

Linker B: 5'-CCG GGA TGA CCT TAG GCT CAG-3`

Prolink 2.060 I: 5'-CTA GCG ATC CTT AAG CTG C-3`

Prolink 2.060 II: 5'-TCA GCA GCT TAA GGA TCG-3`

PE01: 5'-TGA GCT GTG GTG TA GGT CGC-3`

PE02: 5'-CAA CAG ATG GAG TTC CCG TC-3`

PE03: 5'-GAC AGT CTG TGC AAG GTT AGG-3`

PE04: 5'-TGG TGC CTA AAG TGT ATC CC-3`

PE05: 5'-GCA TCC TAT GAG ACA GTC TGT GCA AGG TTA GG-3`

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Sterilisation von Lösungen und Geräten

Alle hitzestabilen Materialien, Medien und Lösungen wurden 20 min bei 120 °C und 2 bar autoklaviert. Glasgeräte und Pipetten wurden für mindestens 4 h bei 150 °C im Trockenschrank sterilisiert. Hitzelabile Lösungen wurden mit H₂O_{bidest.} angesetzt und sterilfiltriert.

3.2.2 Kultivierung von *Escherichia coli*-Stämmen

Die Bakterienstämme *E. coli* DH5α, XL1-Blue und JM109 (3.1.11) dienten zur Vermehrung rekombinanter Plasmide. Die Kultivierung erfolgte in ampicillinhaltigen Nährmedien und –böden (3.1.6).

Feste Nährböden dienten zum Anlegen von Vereinzelungsaustreichen und zur Anzucht einzelner Bakterienkolonien. Zum Anlegen einer Plattenkultur wurden Bakterien einer Flüssig- oder Dauerkultur auf Agarplatten überimpft. Die Platten wurden für mindestens 12 h bei 37 °C invertiert bebrütet. Bakterien können als Plattenkulturen bei 4 °C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur Anlage von Dauerkulturen wurden 1,5 ml einer frischen Flüssigkultur mit 0,5 ml 80 % (v/v) Glycerin in LB-Medium versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in sterilen Kryoröhrchen bei –80 °C gelagert.

Für analytische Plasmidisolierungen und als Vorkultur für größere Volumina wurden 5 ml LB-Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie von einer Plattenkultur beimpft und in 20-ml-Kulturröhrchen über Nacht bei 150-200 rpm und 37 °C inkubiert.

Für präparative Plasmidisolierungen wurden 150 ml LB-Flüssigmedium in einem 500 ml Schüttelkolben mit Schikanen mit 100 µl Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C kultiviert.

3.2.3 Transformation von Bakterien

3.2.3.1 Herstellung von transformationskompetenten *E. coli* DH5a und XL1-Blue Zellen

Die Herstellung von transformationskompetenten *E. coli* DH5α und XL1-Blue Zellen erfolgte nach der Vorschrift von Hanahan (1983).

Ausgehend von einer Dauerkultur wurde eine Plattenkultur der *E. coli* Zellen auf SOB-Agar-Platten angelegt. 5-10 Einzelkolonien wurden in 1 ml SOB-Medium suspendiert und mit dieser Suspension 100 ml SOB-Medium in einem 1 Liter-Schüttelkolben mit

Schikanen angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 200-250 rpm bis eine OD von 0,44-0,55 bei einer Wellenlänge von 556 nm erreicht wurde. Die Kultur wurde 10 min auf Eis abgekühlt, in sterile SS34-Röhrchen überführt und die Bakterien 10 min bei 4 °C und 2.500 rpm (SS34-Rotor) sedimentiert. Das Sediment wurde in 14 ml FSB-Puffer resuspendiert, 15 min auf Eis gekühlt und erneut wie oben zentrifugiert. Das Sediment wurde in 3,36 ml FSB-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 117,6 µl DMSO wurde sofort gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden erneut 117,6 µl DMSO zugegeben und sofort gemischt. Die so hergestellten kompetenten Zellen wurden sofort zu je 220 µl aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Die erzielten Transformationskompetenzen lagen bei ca. 10⁸ cfu/µg DNA.

FSB-Puffer:	100	mM	KCl x 4 H ₂ O
	45	mM	MnCl ₂ x 4 H ₂ O
	10	mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	3	mM	Hexamincobalt(III)trichlorid
	10	mM	Kaliumacetat pH 7,5
	10	% (w/v)	Glycerin
			sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern

3.2.3.2 Herstellung von transformationskompetenten *E. coli* JM109 Zellen

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli* JM109 Zellen erfolgte ebenfalls nach einer Vorschrift von Hanahan (1985). Die Puffer und Inkubationsbedingungen unterscheiden sich jedoch zu dem in Punkt 3.2.3.1 beschriebenen Verfahren.

Von einer Plattenkultur der *E. coli* JM109 Zellen auf M-9 Agar-Platten wurden 5-10 Einzelkolonien in 1 ml LB Medium suspendiert und mit dieser Suspension 250 ml LB-Medium, das 20 mM MgSO₄ enthält, in einem 1 Liter Schüttelkolben mit Schikanen angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 200 rpm bis eine OD von 0,4-0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht wurde. Die Kultur wurde auf GSA-Zentrifugenbecher aufgeteilt und 5 min bei 4 °C und 4.500 g sedimentiert. Das Sediment wurde in dem 0,4fachen Volumen (bezogen auf das Kulturvolumen) eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden vereinigt, 5 min auf Eis inkubiert und erneut wie zuvor zentrifugiert. Das Sediment wurde in dem 0,04fachen Volumen, bezogen auf das Kulturvolumen, eiskaltem TFB2-Puffer vorsichtig resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde zu je 200 µl aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

M-9 Nährboden:	6	g/l	Na ₂ HPO ₄
	3	g/l	KH ₂ PO ₄
	0,5	g/l	NaCl
	1	g/l	NH ₄ Cl
	15	g/l	Agar
			pH 7,4 mit 10 N NaOH einstellen und autoklavieren.

			Die Lösung auf 50 °C abkühlen lassen und folgende Substanzen steril zugeben:
	2	ml	1 M MgSO ₄
	0,1	ml	1 M CaCl ₂
	10	ml	20 % (w/v) Glucose
	1	ml	1 M Thiaminhydrochlorid
TFB1-Puffer:	30	mM	Kaliumacetat
	10	mM	CaCl ₂
	50	mM	MnCl ₂
	100	mM	RbCl
	15	% (v/v)	Glycerin pH 5,8 mit 1 M Essigsäure einstellen, sterilfiltrieren.
TFB2-Puffer:	10	mM	MOPS oder PIPES pH 6,5
	75	mM	CaCl ₂
	10	mM	RbCl
	15	% (v/v)	Glycerin pH 6,5 mit 1M KOH einstellen, sterilfiltrieren.

3.2.3.3 Transformation von *E. coli* DH5a und XL1-Blue Zellen

Zur Bestimmung der Transformationskompetenz wurde 1 ng zirkuläre pBlueskript II SK(-)-DNA eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten 10 µl Wasser. Für die Transformation von Ligationsansätzen wurden 10 µl des Ansatzes eingesetzt.

Die DNA-Lösungen wurden in einem eisgekühlten Greinerröhrchen vorgelegt und mit 200 µl auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen versetzt. Die Transformationsansätze wurden durch leichtes Schwenken des Röhrchens durchmischt, 40 min auf Eis, 90 sec bei 42 °C sowie 3 min auf Eis inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit 100 µl kompetenten Zellen und 10 µl H₂O_{bidest.} mitgeführt. Anschließend wurden die Transformationsansätze mit SOC-Medium auf ein Endvolumen von 1 ml eingestellt und 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Von diesem Transformationsansatz wurden kurz vor dem Ausplattieren 200 µl entnommen, mit 40 µl IPTG und 40 µl X-gal versetzt, kurz vermischt und sofort auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C invertiert bebrütet.

IPTG-Lösung: 100 mM IPTG in H₂O_{bidest.}

X-gal-Lösung: 4 % (w/v) X-gal in DMF

3.2.3.4 Transformation von *E. coli* JM109 Zellen

Zur Transformation von *E. coli* JM109 Zellen wurden 10-20 µl Ligationsansatz in eisgekühlten Greinerröhrchen vorgelegt und 200 µl eine auf Eis aufgetaute kompetente JM109 Zellensuspension (3.2.3.2) zugegeben. Der Transformationsansatz wurde vorsichtig durch Schwenken durchmischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Inkubation von 60 s bei 42 °C wurden die Zellen 2 min auf Eis abgekühlt und mit SOC-Medium ein Endvolumen von 1 ml eingestellt. Der Ansatz wurde 1,5 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert und 200 µl auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Die Plattenkultur wurde über Nacht bei 37 °C invertiert bebrütet.

3.2.4 Präparation von Plasmid-DNA

3.2.4.1 Analytische Plasmidisolierung

Die Präparation von Plasmiden aus *E. coli*-Transformanten für analytische Zwecke wurde nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt.

1,5 ml einer 5 ml LB-Amp-Flüssigkultur (3.2.2) wurden in ein Eppendorgefäß überführt und die Bakterien 30 sec in der Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 50-100 µl entfernt und das Sediment darin resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 300 µl Lyse-Puffer zugegeben, sofort durchmischt und 1 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 wurde der Ansatz neutralisiert und die Zelltrümmer und chromosomale DNA durch 2minütige Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde in neues Eppendorgefäß überführt, die Plasmid-DNA mit 900 µl eiskaltem Ethanol p.a. gefällt und 5 min in der Tischzentrifuge sedimentiert. Das Sediment wurde zweimal mit 400 µl eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen, 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 30 µl TE/RNase A Puffer aufgenommen. Zur vollständigen Hydrolyse der RNA wurde der Ansatz 15 min bei 65 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

Lyse Puffer:	10	mM	Tris-HCl pH 8,0
	1	mM	EDTA
	0,5	% (w/v)	SDS
	100	mM	NaOH die Zugabe von NaOH erfolgt kurz vor Gebrauch des Puffers
TE/RNase A Puffer:	10	mM	Tris-HCl pH 8,0
	1	mM	EDTA
	20	µg/ml	RNase A
RNase A Stammlösung:	20	mg/ml	RNase A

3.2.4.2 Präparative Plasmidisolierung

Die Präparation von Plasmid-DNA zur Klonierung, Sequenzierung, Transfektion oder Transformation erfolgte nach Qiagen (Attal et al., 1990).

Die Bakterien einer 150 ml LB-Amp-Flüssigkultur (3.2.2) wurden durch 15minütige Zentrifugation im GSA-Rotor bei 4 °C und 3.200 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P2 wurde die Lösung vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Lyse der Bakterienzellen wurde durch Zugabe von 4 ml eisgekühltem Puffer P3 und 15minütiger Inkubation auf Eis gestoppt. Die viskose Lösung wurde in ein SS34-Röhrchen überführt und die Zelltrümmer mit der chromosomalen DNA 30 min bei 16.000 rpm und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteur-Pipette abgezogen und auf eine Qiagen tip-100 Säule aufgetragen, welche zuvor mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert wurde. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen und anschließend die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF in ein Greinerröhrchen von der Säule eluiert. Durch Zugabe von 5 ml Isopropanol wurde die Plasmid-DNA gefällt (3.2.5.2) und das Sediment in 50-100 µl TE-Puffer aufgenommen. Reinheit und Konzentration der Plasmid-DNA wurden spektralphotometrisch bestimmt (3.2.13).

Puffer P1:	10	mM	EDTA pH 8,0
	50	mM	Tris-HCl pH 8,0
	100	µg/ml	RNase A
Puffer P2:	200	mM	NaOH
	1	% (w/v)	SDS
Puffer P3:	3	M	Kaliumacetat pH 5,2
Puffer QBT:	750	mM	NaCl
	50	mM	MOPS pH 7,0
	0,15	% (w/v)	Triton-X 100
	15	% (v/v)	EtOH p.a.
Puffer QC:	1	M	NaCl
	15	% (v/v)	EtOH p.a.
	50	mM	MOPS pH 7,0
Puffer QF:	50	mM	MOPS pH 8,2
	1,25	M	NaCl
	15	% (v/v)	EtOH p.a.

3.2.5 Reinigung von Nukleinsäuren

3.2.5.1 Phenolextraktion

Zur Extraktion von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurden diese mit dem einfachen Volumen an TE-gesättigtem Phenol versetzt, durch kräftiges Schütteln durchmischt, und 5 min in der Tischzentrifuge bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Die Phenolphase wurde verworfen. Das gelöste Phenol in der wässrigen Phase wurde zweimal mit dem einfachen Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und wie beschrieben zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde die DNA wie unter 3.2.5.2 beschrieben präzipitiert.

TE-gesättigtes Phenol: 4 g kristallines Phenol in 1 ml TE-Puffer bei 65 °C lösen, Sambrook et al. (1989)

3.2.5.2 Ethanol- und Isopropanolfällung

Zur Konzentrierung, Änderung der Pufferbedingungen oder Entfernung von Proteinen, Salzen und nichtinkorporierten Nukleotiden wurden Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen mit Ethanol oder Isopropanol präzipitiert.

DNA-Lösungen wurden mit dem 0,1fachen Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2), RNA-Lösungen mit dem 0,1fachen Volumen einer 2 M Natriumacetatlösung (pH 4,0) versetzt und das 2,5fache Volumen Ethanol oder das 1fache Volumen Isopropanol zugegeben. Die Fällung erfolgte bei Nukleinsäurekonzentrationen $> 0,1 \mu\text{g/ml}$ für 5 min bei -20°C und bei stark verdünnten Nukleinsäurelösungen ($< 10 \text{ ng/ml}$) für 1 h bis über Nacht bei -20°C bzw. -80°C . Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden durch 5-30minütige Zentrifugation bei 4°C sedimentiert und das Sediment zweimal mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde jeweils 5 min bei 4°C zentrifugiert und die DNA im Vakuum getrocknet. RNA-Sedimente wurden an der Luft getrocknet. Die Nukleinsäuren wurden in TE-Puffer oder Wasser gelöst.

3.2.5.3 Reinigung über das QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen

Einzel- oder doppelsträngige DNA der Größe 100 bp bis 10 kb wurden über Silikamembranen der Firma Qiagen (1990) gereinigt. Diese Methode nutzt die unterschiedliche Bindungsaffinität von DNA an Silikamembranen bei unterschiedlichen pH-Werten und Salzkonzentrationen (Vogelstein und Gillespie, 1979; Hamaguchi, 1962).

Die DNA-Lösung wurde mit dem 5fachen Volumen PB-Puffer versetzt, auf eine QIAquick-Säule aufgetragen und 60 sec in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchbruch wurde verworfen, 750 μl PE-Puffer aufgetragen und die gebundene DNA durch 1minütige Zentrifugation gewaschen. Der Durchbruch wurde erneut verworfen und

zur Entfernung von PE-Pufferresten 1 min zentrifugiert. Die DNA wurde mit 50 µl EB-Puffer und 1minütiger Zentrifugation von der Säule eluiert. Zur Gewinnung höherer DNA-Konzentrationen wurde das Volumen des EB-Puffers auf 30 µl reduziert, der Puffer 1 min auf der Säule belassen und anschließend 1 min zentrifugiert.

EB-Puffer:	10	mM	Tris-HCl pH 8,5
	1	mM	EDTA

3.2.5.4 Reinigung radioaktiv markierter DNA-Fragmente und Oligonukleotide über das QIAquick Nukleotid Removal Kit von Qiagen

Zur Abtrennung freier Nukleotide von DNA-Fragmenten oder Oligonukleotiden nach radioaktiver Markierung (3.2.7) wurden Silikamembranen der Firma Qiagen verwendet. Der Markierungsansatz wurde mit dem 10fachen Volumen (bei DNA-Fragmenten \geq 100 bp das 5fache Volumen) PN-Puffer versetzt, auf die Säule aufgetragen und 60 sec bei 6.000 rpm zentrifugiert. Der Durchbruch wurde verworfen und die Säule zweimal mit 500 µl PE-Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde jeweils 60 sec bei 6.000 rpm zentrifugiert und anschließend zur Entfernung von Pufferresten 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurden 100 µl EB-Puffer (3.2.5.3) auf die Säule gegeben und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Zur Gewinnung höherer DNA-Konzentrationen wurde das Volumen des EB-Puffers auf 50 µl reduziert, der Puffer 1 min auf der Säule belassen, und anschließend 1 min zentrifugiert.

3.2.5.5 Gelpermeationschromatographie zur Abtrennung freier Nukleotide

Zur Abtrennung freier Nukleotide von DNA-Fragmenten oder Oligonukleotiden nach radioaktiver Markierung (3.2.7) wurde eine Gelpermeationschromatographie an Sephadex G-25 oder G-50 durchgeführt.

Eine silikonisierte Pasteur-Pipette wurde mit silikonisierter Glaswolle abgedichtet und mit 1,5 ml vorgequollenem Sephadex G-25 oder G-50 Material luftblasenfrei befüllt. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 10 ml Wasser wurde der Markierungsansatz aufgetragen und mit Wasser eluiert. Mit einem Geiger-Müller-Zähler wurde der Zeitpunkt bestimmt, an dem die radioaktiv markierte Probe aus der Säule austrat. Ab diesem Zeitpunkt wurden 20 Fraktionen zu je drei Tropfen in Eppendorfgefäßen gesammelt und durch Messung der Cerenkov-Strahlung im Szintillationszähler vermessen.

Die Spitzenfraktionen wurden entweder direkt zur Hybridisierung eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.2.6 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

3.2.6.1 Elution mit β -Agarase I

(New England BioLabs)

Nach Restriktion der DNA und Auftrennung der DNA-Fragmente mittels nativer Gelelektrophorese unter Verwendung von Large DNA Low Melt Agarose wurde das entsprechende DNA-Fragment mit einem sterilen Skalpell unter UV-Durchlicht aus dem Gel geschnitten und in ein vorbereitetes Eppendorfgefäß überführt. Das Volumen des Gelstückes wurde durch Wiegen bestimmt und mit 1/10 des Volumens an 10 x β -Agarase I Puffer eingestellt. Nach 15minütigen Schmelzen des Gelstückes bei 65 °C und Abkühlen der Lösung auf 40 °C wurden 2 μ l β -Agarase I (1U/ μ l) pro 200 μ l Gellösung zugegeben. Die Hydrolyse der Agarose erfolgte für 2 h bei 40 °C. Anschließend wurde 1/10 des Volumens an 3M NaOAc pH 5,2 zugegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Verbliebene Agarosereste wurden durch 15minütige Zentrifugation bei 4 °C in der Tischzentrifuge abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA durch Isopropanolfällung (3.2.5.2) gereinigt.

10 x β -Agarase I Puffer	100	mM	Tris-HCl pH 6,5
	10	mM	EDTA

3.2.6.2 Elution über silikonisierte Glaswolle

Zur Isolierung von DNA-Restriktionsfragmenten wurde die Methode nach Cao und Brosius (1993) verwendet. Ein Eppendorfgefäß wurde am Boden mit einer Kanüle durchstochen und 2/3 des Gefäßes mit silikonisierter Glaswolle befüllt. Nach Restriktion der DNA und Auftrennung der DNA-Fragmente mittels nativer Gelelektrophorese (3.2.12.1) wurde das entsprechende Fragment mit einem sterilen Skalpell unter UV-Durchlicht aus dem Gel geschnitten und in das vorbereitete Eppendorfgefäß überführt. Dieser Ansatz wurde in ein zweites Eppendorfgefäß gestellt und die DNA durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 4.000 rpm eluiert. Zur Entfernung von Schwebeteilchen wurde das Eluat 5 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Inaktivierung eventuell vorhandener DNasen wurde die Lösung mit Proteinase K auf eine Endkonzentration von 25 ng/ μ l eingestellt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Hitzedesaktivierung der Proteinase K bei 70 °C für 10 min wurde die DNA über das QIAquick PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt.

Proteinase K Stammlösung:	0,5	μ g/ μ l	Proteinase K in H ₂ O _{bidest.}
---------------------------	-----	------------------	---

3.2.7 Radioaktive Markierung von DNA

3.2.7.1 5'-Phosphorylierung mit γ - ^{32}P -ATP

Die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden oder 5'-dephosphorylierten DNA-Fragmenten mit ^{32}P erfolgte modifiziert nach Sambrook et al. (1989).

5-40 pmol Oligonukleotide oder 5'-dephosphorylierte DNA-Fragmente (3.2.8.2) wurden in einem Reaktionsvolumen von 20-50 μl unter den vom Hersteller angegebenen Pufferbedingungen mit 50 μCi γ - ^{32}P -ATP und 10 U T4 Polynukleotidkinase versetzt. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C wurde erneut 10 U T4 Polynukleotidkinase zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nicht umgesetztes γ - ^{32}P -ATP wurde durch Gelpermeationschromatographie (3.2.5.5) oder über das QIAquick Nukleotid Removal Kit (3.2.5.4) entfernt.

3.2.7.2 Radioaktive Markierung mit dem Klenow-Fragment

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch Auffüllen der 5'-überstehenden Enden erfolgte mit dem Klenow-Fragment nach folgendem Pipettierschema:

x	μl	DNA-Fragment (400-600 ng)
3	μl	10 x React 2 Puffer
1	μl	0,5 mM dTTP
1	μl	0,5 mM dGTP
2	μl	α - ^{32}P -dATP
2	μl	α - ^{32}P -dCTP
2	μl	Klenow-Fragment 0,5 U/ μl
		ad 30 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Das Klenow-Fragment (4,3 U/ μl) wurde zunächst mit Klenow Dilution Puffer auf eine Konzentration von 0,5 U/ μl eingestellt. Nach 30-60minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz über das QIAquick PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt.

Klenow Dilution Puffer:	100	mM	Kaliumphosphat pH 7,0
	10	mM	β - Mercaptoethanol
	50	% (v/v)	Glycerin
10 x React 2 Puffer:	500	mM	Tris-HCl pH 8,0
	100	mM	MgCl_2
	500	mM	NaCl

3.2.8 Enzymatische Modifikation von DNA

3.2.8.1 Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Die Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte hinsichtlich Pufferbedingungen und Reaktionstemperatur nach Herstellerangaben. Das Standardreaktionsvolumen betrug 20 μ l. Die Restriktionen wurden durch native Gelelektrophorese (3.2.12.1) überprüft. Für weitere enzymatische Reaktionen unter anderen Pufferbedingungen wurde die DNA durch Phenolextraktion (3.2.5.1) und Isopropanolfällung (3.2.5.2) oder über das QIAquick PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt.

3.2.8.2 5'-Dephosphorylierung von DNA

Die Entfernung endständiger Phosphatgruppen zur Unterbindung der Religation des hydrolysierten Vektors oder zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten durch 5'-Phosphorylierung (3.2.7.1) erfolgte mittels Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Herstellerangaben gewählt. Das Enzym wurde nach beendeter Reaktion durch Einstellen der Lösung auf 5 mM EDTA und 10minütiger Inkubation bei 70 °C deaktiviert. Die DNA wurde durch Phenolextraktion (3.2.5.1) und Isopropanolfällung (3.2.5.2) oder über das QIAquick PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt.

3.2.8.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die enzymatische Verknüpfung von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung der T4 DNA Ligase. In einem Reaktionsvolumen von 10-30 μ l wurden 20-120 ng Vektor-DNA und ein 1-3facher molarer Überschuss der zu inserierenden DNA in Ligationspuffer mit 1 U T4 DNA Ligase versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 14 °C. Der Ligationsansatz wurde direkt in die Transformation eingesetzt oder bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.9 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich DNA-Abschnitte mit Hilfe zweier Oligonukleotid-Primer *in vitro* amplifizieren (Mullis, 1990, Mullis und Faloona, 1987). In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR außer zur Amplifikation von DNA-Abschnitten zur Herstellung von einseitig markierten DNA-Fragmenten für Footprinting-Experimente (3.2.18) verwendet. Die DNA-Synthese erfolgte unter Verwendung der thermostabilen *Taq*-Polymerase oder *Pwo*-DNA-Polymerase mit Korrekturleseaktivität.

3.2.10 Insertionsverkürzung rekombinanter Plasmid-DNA (*Nested Deletion*)

Die einseitige Insertionsverkürzung (*Nested Deletion*) von rekombinanter Plasmid-DNA erlaubt beispielsweise die Sequenzierung von großen Insertionen mit nur einem universellen Sequenzierprimer. Hierbei erhält man ausgehend von einem großen Klon eine Serie von insertionsverkürzten Subklonen. Um unidirektionale Deletionen in doppelsträngiger DNA zu erreichen, wird die zirkuläre Plasmid-DNA, die das vollständige Fremd-DNA-Fragment enthält, mit zwei Restriktionsendonukleasen hydrolysiert, so dass ein 5'-überstehendes oder ein glattes Ende (Nuklease sensitives Ende) und ein 3'-überstehendes Ende (Nuklease resistentes Ende) in der Polylinkerregion entsteht, wobei keines der Enzyme innerhalb der Insertion hydrolysieren sollte. Das linearisierte Plasmid wird nun mit Exonuklease III, einer 3'-Exonuklease, spezifisch vom 5'-Ende her einzelsträngig abgebaut. Das Ausmaß des Abbaus lässt sich durch die Inkubationszeit steuern, indem man Proben zu verschiedenen Zeitpunkten der Exonuklease III-Hydrolyse entnimmt und die Reaktion abstoppt. Man erhält so eine Population von Plasmiden mit unterschiedlichen Insertionsdeletionen. Die entstandenen einzelsträngigen Enden werden nun durch Zugabe des Enzyms Nuklease S1 entfernt. Die verkürzten DNA-Moleküle werden mit T4-DNA-Ligase rezirkularisiert, so dass die Bindestelle des universellen Sequenzierprimers neben den neuen Enden liegt, die durch die Exonuklease-Hydrolyse geschaffen wurden. Die so hergestellten verkürzten Plasmide werden in kompetente *E.coli* Zellen transformiert. Durch Sequenzierung dieser Klone mit Hilfe eines Universalprimers erhält man überlappende Sequenzen, so dass sich die gesamte zusammenhängende Sequenz der Insertion ergibt.

Alle Reagenzien wurden dem „double-stranded Nested Deletion Kit“ von Pharmacia Biotech entnommen.

5 µg DNA wurden in 35 µl H₂O_{bidest.} gelöst, mit jeweils 5 µl Restriktionsenzym (10 U/µl) und 5 µl 10 x Reaktionspuffer versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme 10 min bei 70 °C hitzedesaktiviert. 20 µl der Restriktionsansätze wurden entnommen, mit 20 µl Exonuklease III Puffer vermischt und 2 min auf 25 °C äquilibriert.

Anschließend wurde 1 µl Exonuklease III (90-130 U/µl) zugegeben und nach folgenden Zeitpunkten jeweils 2 µl des Reaktionsansatzes entnommen: 0 sec/ 20 sec/ 40 sec / 1 min/ 1,5 min/ 2 min/ 3 min/ 4 min/ 5 min/ 6 min/ 8 min/ 10 min/ 15 min/ 20 min/ 30 min/ 40 min/ 50 min/ 60 min.

Die entnommenen Proben wurden in Eppendorfgefäße überführt, in denen je 3 µl S1-Mix vorgelegt waren und sofort auf Eis gestellt. Nach der letzten Probenentnahme wurden alle Ansätze 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zugabe von 1 µl S1-Stopplösung

10 min bei 65 °C inkubiert. Zur Bestimmung der Größe der einzelnen Deletionen wurden 2,5 µl jeder Probe in einem 1 %igen Agarosegel gelelektrophoretisch getrennt (3.2.12.1). Während der Gelelektrophorese wurde die andere Hälfte der Proben zur Ligation eingesetzt. Hierzu wurden 2,5 µl jeder Probe mit 17 µl Ligations-Mix vermischt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden Proben von verschiedenen Zeitpunkten, die eine geeignete Größenverteilung aufwiesen, für die Transformation ausgewählt. 10 µl der entsprechenden Ligationsansätze wurden dann zur Transformation (3.2.3) eingesetzt, die restlichen Proben wurden bei –20 °C aufbewahrt.

S1-Puffer:	150	mM	Kaliumacetat pH 4,6
	1,25	M	NaCl
	5	mM	ZnSO ₄
	25	% (w/v)	Glycerin

S1-Mix:	33	µl	S1-Puffer
	66	µl	H ₂ O _{bidest.}
	1	µl	S1 Nuklease

2 x Exonuklease III Puffer:	400	mM	Tris-HCl pH 8,0
	4	mM	MgCl ₂
	75	mM	NaCl

S1-Stopplösung:	303	mM	Tris-Base
	50	mM	EDTA

Ligations-Mix:

40	µl	10 x Ligationspuffer
80	µl	25 % (w/v) PEG
2	µl	T4 DNA Ligase
218	µl	H ₂ O

3.2.11 DNA-Sequenzierung

3.2.11.1 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Didesoxy-Kettenterminations-Methode von Sanger (1977). Diese beruht auf der enzymatischen Synthese einer radioaktiv markierten komplementären Kopie der zu sequenzierenden DNA, gefolgt von einem statistisch verteilten Synthesestopp durch Verwendung von 2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphaten. Zur Sequenzierung wurden 5 µg nach Qiagen (3.2.4.2) präparierte Plasmid-DNA und 10 pmol eines synthetischen Primers eingesetzt. Die Vorbereitung der DNA sowie die Sequenzierreaktion erfolgte unter Verwendung von α -³⁵S-dATP und dem T7 SequencingTM Kit der Firma Pharmacia nach dem vorgeschriebenen Protokoll. Die Reaktionsprodukte wurden in einem denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel (3.2.12.2) getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.2.11.2 Maxam-Gilbert A+G Sequenzierreaktion

Diese Methode wurde von Maxam und Gilbert (1980) entwickelt und beruht auf einer spezifischen Spaltung endmarkierter DNA an chemisch modifizierten Nukleotiden. Die Bedingungen sind so gewählt, dass jedes DNA-Molekül im Durchschnitt nur einmal an einer der chemisch modifizierten Basen gespalten wird.

Zur chemischen Modifikation der Basen wurden 8 µl endständig markierte DNA und 20 µl 4 % (v/v) Ameisensäure, welche zuvor mit 1 M Piperidin auf pH 2,0 eingestellt wurde, 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Reaktion auf Eis gestoppt und im Vakuum getrocknet. Zur Fragmentierung löste man die getrockneten Niederschläge in 30 µl 1 M Piperidin und erhitzte diese 30 min bei 90 °C. Nach dem Abkühlen wurde das Piperidin im Vakuum entfernt. Die Niederschläge wurden in 20 µl Wasser aufgenommen und erneut im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde mit 800 µl 80 %igem Ethanol gewaschen, das Sediment im Vakuum getrocknet und in 3 µl Auftragspuffer und 3 µl Wasser aufgenommen.

Auftragspuffer:	97,5	% (v/v)	Formamid (deionisiert)
	10	mM	EDTA pH 7,5
	0,3	% (w/v)	Xylencyanol FF
	0,3	% (w/v)	Bromphenolblau

3.2.12 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

3.2.12.1 Native Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Trennung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten erfolgte nach ihrer Größe in 0,7-2,0 %igen Agarosegelen in 1 x TAE Puffer (3.1.7; Sambrook et al., 1989). Die Proben wurden mit 1/5 Volumen DNA-Auftragspuffer (3.1.7) versetzt und bei 50-90 V für 2 h in Minigelen (Laufstrecke 8 cm) bzw. bei 100-150 V für 3-4 h in Midi- oder Maxigelen (Laufstrecke 18 cm) getrennt. Die DNA wurde nach der Elektrophorese durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert und photographiert. Als Größenstandard wurden DNA-Lösungen mit Fragmenten bekannter Größe (3.1.10) mitgeführt. Die Größe unbekannter Fragmente wurde durch Erstellung einer Eichgeraden ermittelt, in der die Größe der Fragmente (ln bp) gegen den R_F -Wert (Laufstrecke [cm]/ Lauffront [cm]) aufgetragen wurden.

3.2.12.2 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA

Zur Analyse der ^{35}S -markierten Syntheseprodukte der DNA-Sequenzierreaktion (3.2.11.1) und der ^{32}P -markierten DNase I Footprinting Reaktionen (3.2.18) wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen mit 7 M Harnstoff durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in der vertikalen LKB-Makrophor-Apparatur mit keilförmigen 5 oder 6 %igen Polyacrylamid-Harnstoffgelen von 53 x 21 cm Größe. Die Keilgele, die im unteren Bereich etwa viermal dicker als im oberen Plattenbereich sind und somit eine in Richtung des unteren Endes abnehmende Feldstärke aufweisen, verhindern die Abstandsvergrößerung zwischen den Banden mit niedrigerem Molekulargewicht.

Das Sequenziergel bestand aus zwei Glasplatten, die mit jeweils unterschiedlichen Lösungen behandelt wurden, damit nach erfolgter Gelelektrophorese das Gel vollständig an einer der beiden Platten (Öhrchenplatte) haften blieb.

Die Thermostatplatte wurde mit Spülmittel gründlich abgewaschen, mit Aceton und 0,5 M NaOH abgerieben und zweimal mit Isopropanol gereinigt und poliert. Anschließend wurde die Platte zweimal mit 5 ml Repelsilan beschichtet und mit 25 ml Isopropanol abgespült und nochmals poliert.

Die Öhrchenplatte wurde nach gründlicher Reinigung mit Spülmittel und Aceton zweimal mit Isopropanol abgerieben und poliert. Dann wurde sie mit 5 ml Bindsilan beschichtet, mit 25 ml Isopropanol abgespült und trockenpoliert.

Die behandelte Thermostatplatte wurde auf einer Schiebeapparatur waagrecht ausgerichtet, keilförmige Abstandhalter (Spacer) von 0,1 bis 0,4 mm Dicke auf beiden Längsseiten der Platte aufgebracht, und mit Klammern fixiert.

Die Polymerisation der Gellösung wurde durch Zugabe von 500 µl 10 %iger Ammoniumperoxodisulfatlösung und 60 µl TEMED gestartet. Die Gellösung wurde nun auf die Thermostatplatte gegeben und simultan dazu die Öhrchenplatte entlang der Abstandshalter über die Thermostatplatte geschoben, so dass sich ein gleichmäßiger luftblasenfreier Film zwischen den Platten ausbildete, der nach Einsetzen des Taschenformers mindestens 1 h polymerisierte.

Für die Elektrophorese wurde das Gel in eine vertikale Gelapparatur gespannt und die Thermostatplatte an ein 55 °C Wasserbad angeschlossen. Die Kathoden- und Anodentanks der Gelapparatur wurden mit 1 x TBE-Puffer befüllt, der Probenkamm entnommen, die Taschen gespült und eine 30minütige Vorelektrophorese bei 1.000 V und ca. 10 mA durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden vor dem Probenaufrag 5 min bei 95 °C denaturiert, in Eiswasser gestellt und jeweils 1,5 µl der Sequenzierreaktion aufgetragen. Zum Einlaufen der Proben wurde zunächst eine Spannung von 1.500 V angelegt und nach 5 min auf 2.500 V (ca. 30 mA) erhöht. Nach etwa 90 min war die Elektrophorese beendet, die Pufferkammern wurden entleert und das Gel mitsamt der Öhrchenplatte von der Thermostatplatte abgeholt.

Zur Fixierung wurde das Gel 1 h in 10 %iger Essigsäure geschwenkt und dann bei 80 °C in einem Trockenschrank für mindestens 2 h getrocknet. Nach Abkühlen des Gels wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und 1-2 Tage bei Raumtemperatur exponiert. Das Gel wurde nach der Exposition mit 0,25 M NaOH von der Öhrchenplatte abgelöst.

40 % Acrylamid-
Stammlösung:

380	g/l	Acrylamid
20	g/l	Bisacrylamid

Gellösung (5 %):

42	g	Harnstoff
12,5	ml	40 % Acrylamid-Stammlösung
10	ml	10 x TBE-Puffer
44,5	ml	H ₂ O
		10 min unter Vakuum entgasen und filtrieren (Porengröße 0,45 µm)
500	µl	10 % (w/v) APS
60	µl	TEMED

Bei Verwendung einer 6 %igen Gellösung wurden 14,5 ml 40 % Acrylamidlösung und entsprechend 42,5 ml H₂O eingesetzt.

10 x TBE-Puffer:

121	g/l	Tris
51,3	g/l	Borsäure
3,7	g/l	EDTA x 2 H ₂ O

Repelsilanlösung:

2	% (w/v)	Dimethyldichlorsilan in 1,1,1 Trichlorethan
---	---------	---

Bindesilanlösung:	5 ml	Isopropanol p.a.
	175 µl	10 % (v/v) Essigsäure
	17,5 µl	Methacrylsäure-3-trimethoxysilylpropylester

3.2.12.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Zur Analyse von RNA wurde diese unter denaturierenden Bedingungen nach Fournay et al. (1988) in Formaldehyd-Agarosegelen elektrophoretisch getrennt. Alle Geräte und Lösungen wurden vor der Benutzung besonders behandelt, um unter RNase freien Bedingungen zu arbeiten (3.2.14).

Zur Herstellung der Gele wurden 1,3 g Agarose in 10 ml 10 x MOPS-Puffer und 87 ml DEPC-Wasser durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf etwa 50 °C wurden 5,1 ml 37 %ige Formaldehydlösung zugegeben, der Ansatz durch Schwenken gemischt und in die vorbereitete Flachbett-Gelelektrophoreseapparatur luftblasenfrei eingegossen. Nach Erstarren der Gellösung wurde diese mit 1 x MOPS-Puffer überschichtet, zusätzlich wurden 30 ml 37 %ige Formaldehydlösung zugegeben. 10 bis 30 µg RNA wurden in 10 µl DEPC-Wasser aufgenommen, mit 20 µl RNA-Auftragspuffer versetzt und 15 min bei 65 °C denaturiert. Die RNA-Lösung wurde sofort auf Eis überführt, mit 2 µl Ethidiumbromidlösung versetzt und in die Probentasche eingebracht. Die Elektrophorese erfolgte für 1-1,5 h bei 90 V oder über Nacht bei 30 V. Anschließend wurde die RNA unter UV-Licht visualisiert und photographiert.

RNA-Auftragspuffer:	0,75 ml	Formamid (deionisiert)
	0,15 ml	10 x MOPS-Puffer
	0,24 ml	37 %ige Formaldehydlösung
	0,1 ml	DEPC-Wasser
	0,1 ml	Glycerin
	0,8 ml	10 %ige Bromphenolblaulösung

Ethidiumbromid: 1 mg/ml in DEPC-Wasser

3.2.13.1 Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von nukleinsäurehaltigen Lösungen wurde durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm an einem Hitachi U 1100 Spektralphotometer in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke nach folgender Formel bestimmt:

$$1,0 A_{260}\text{-Einheit} = 50 \mu\text{g/ml ds DNA} = 40 \mu\text{g/ml RNA} = 40 \mu\text{g/ml ssDNA}$$

Die Konzentrationsmessung von RNA wurde an einem Beckmann DU-40 Spektralphotometer in 100 µl Quarzküvetten vorgenommen.

Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung lässt sich aus dem Quotienten A_{260}/A_{280} bestimmen. Reine Präparationen haben einen Wert zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Werte deuten auf Proteinverunreinigungen hin, während höhere Werte Verunreinigungen niedermolekularer aromatischer Verbindungen, wie Phenolsuren und Mononukleotide, anzeigen.

3.2.14 Präparation von RNA aus Gewebe

Beim Umgang mit Ribonukleinsäuren mussten besondere Vorkehrungen getroffen werden, um Kontaminationen durch RNasen zu verhindern (Sambrook et al., 1989).

Hitzestabile Gefäße und Geräte wurden gründlich gereinigt, mit Ethanol ausgespült und verblieben bis vor Gebrauch für mindestens 8 h bei 150 °C. In $H_2O_{\text{bidest.}}$ und in wässrigen Lösungen wurden RNasen durch den Zusatz von Diethylpyrocarbonat inaktiviert. Hierfür wurden die Ansätze mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat versetzt und über Nacht unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Zur anschließenden Zersetzung des Diethylpyrocarbonats wurden die Lösungen vor Gebrauch mindestens zweimal für 15 min bei 120 °C autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden nicht direkt mit Diethylpyrocarbonat behandelt, sondern ausgehend von nukleasefreien Chemikalien mit RNase-freiem $H_2O_{\text{bidest.}}$ hergestellt. Isolierte RNA wurde als Präzipitat bei -20 °C oder für mehrere Wochen bei -80 °C aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch wurde sie durch 30minütige Zentrifugation bei 4 °C sedimentiert, zweimal mit 70 %igem eiskaltem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in $H_2O_{\text{bidest.}}$ gelöst. Die Qualität der RNA wurde durch Messung der Absorption (3.2.13) sowie durch gelelektrophoretische Trennung in denaturierenden Agarosegelen (3.2.12.3) analysiert.

Zur Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus Gewebe wurde das von Chomczynski und Sacchi (1987) beschriebene Verfahren angewandt. Diese einstufige Extraktion mittels Guanidiniumthiocyanat und Phenol-Chloroform eignet sich zur schnellen Präparation von RNA aus RNase-haltigen Quellen in hoher Ausbeute. Die Methode basiert auf dem Zellaufschluss in Anwesenheit von Guanidiniumthiocyanat, das gleichzeitig Zellmembranen lysiert, Proteine denaturiert und RNasen inaktiviert. Mit dem Zellhomogenisat wird daraufhin eine Extraktion mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) durchgeführt, und die RNA durch Präzipitation aus der dabei entstandenen wässrigen Phase gewonnen.

Für die Präparation von RNA aus Schweinegehirn wurde das Ausgangsmaterial schlachtfresh bezogen und in GuSCN-Puffer auf Eis transportiert. Je 5 g grob zerkleinertes Gewebe wurden in sterile SS34-Röhrchen mit 15 ml GuSCN-Puffer überführt

und mit einem Ultra Turrax in kurzen Schüben aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde mit 1,5 ml 2 M NaOAc pH 4,0, 15 ml H₂O-gesättigtem Phenol und 3 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) versetzt und 15 min auf Eis gekühlt. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 8.000 rpm wurde die obere wässrige Phase in ein Greiner-Röhrchen überführt, mit 3 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) versetzt und 20 min bei 4 °C, 6.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige ribonukleinsäurehaltige Phase wurde anschließend in ein neues Greiner-Röhrchen überführt und zur Fällung der RNA mit dem einfachen Volumen Isopropanol versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei -20 °C wurde das Präzipitat durch Zentrifugation für 30 min bei 8.000 rpm und 4 °C sedimentiert. Das RNA-Sediment wurde in 3 ml GuSCN-Puffer gelöst, mit 300 µl 2 M NaOAc pH 4,0 und 3 ml Isopropanol versetzt und 1 h bei -20°C gefällt. Nach der Zentrifugation (30 min, 4 °C, 12.000 rpm) wurde das Sediment mit 70 %igem Ethanol (3.2.5.2) gewaschen, an der Luft getrocknet und 15 min bei 65 °C in H₂O_{bidest.} gelöst. Nach der Konzentrationsbestimmung (3.2.13) wurde die RNA erneut mit Ethanol (3.2.5.2) gefällt und als Präzipitat bei -80 °C gelagert.

GuSCN-Puffer:	4	M	Guanidiniumthiocyanat
	25	mM	tri-Natriumcitrat pH 7,0
	0,5	% (v/v)	Natrium-N-laurylsarkosin
	100	mM	β-Mercaptoethanol

H₂O-gesättigtes Phenol: 4 g Phenol in 1 ml H₂O bei 65 °C lösen.

3.2.15 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch *Primer Extension*

Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes wurde mit der von Sambrook et al. (1989) beschriebenen Methode der „Primer Extension“ durchgeführt.

Zur Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes wird ein 5'-phosphorylierter Oligonukleotidprimer an einer RNA-Matrize durch das Enzym Reverse Transkriptase verlängert und somit ein cDNA-Strang geschrieben, der exakt am 5'-Ende der RNA-Matrize endet. Die Größe der so erhaltenen 5'-markierten cDNA lässt sich durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese, bei der parallel eine Sequenzierreaktion des entsprechenden Bereichs aufgetragen wird, bestimmen.

50-150 µg Gesamt-RNA wurden mit 1×10^7 cpm eines 5'-phosphorylierten Oligonukleotid-Primers in einem Eppendorfgefäß gemischt, mit Ethanol 30 min bei -20 °C gefällt und durch Zentrifugation sedimentiert (3.2.5.2). Das Sediment wurde in 30 µl Hybridisierungspuffer gelöst und 10 min zur Zerstörung möglicher Sekundärstrukturen bei 85 °C denaturiert. Die Hybridisierung von RNA und Oligonukleotid-Primer wurde 8-16 h bei 37 °C durchgeführt. Danach wurden 170 µl

DEPC-Wasser zugegeben, mit Ethanol 1 h bei -20 °C gefällt und durch Zentrifugation sedimentiert (3.2.5.2). Anschließend wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl folgende Substanzen gemischt:

50	mM	Tris-HCl pH 7,6
60	mM	KCl
10	mM	MgCl ₂
1	mM	von jedem dNTP
1	mM	DDT
50	U	M-MLV Reverse Transkriptase

Die Inkubation erfolgte 90 min bei 37 °C. Danach wurde die Reaktion der Reverse Transkriptase durch die Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA und 1 µl RNase A (5 µg/ml) und Inkubation für 15-30 min bei 37 °C gestoppt. Anschließend wurden 150 µl TE/NaCl-Puffer zugegeben und eine Phenolextraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) durchgeführt (3.2.5.1), bevor die radioaktiv markierte cDNA durch Ethanol gefällt (3.2.5.2), in 4 µl TE-Puffer und 6 µl Stopp-Lösung gelöst und bis zur Analyse durch Polyacrylamidgelelektrophorese (3.2.12.2) bei 4°C gelagert wurde.

Hybridisierungspuffer:	40	mM	PIPES pH 6,4
	1	mM	EDTA
	400	mM	NaCl
	80	% (v/v)	Formamid (deionisiert)

TE/NaCl-Puffer:	10	mM	Tris-HCl pH 8,0
	1	mM	EDTA pH 8,0
	100	mM	NaCl

Stopp-Lösung:	97,5	% (v/v)	Formamid (deionisiert)
	10	mM	EDTA pH 7,5
	0,3	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,3	% (w/v)	Xylencyanol FF

3.2.16 Präparation von Kernproteinen

3.2.16.1 Isolierung von Zellkernen und Extraktion von Kernproteinen aus Säugerzellkulturen

Die Präparation von Kernproteinen aus Säugerzellen erfolgte nach der Methode von Schreiber et al. (1989). Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach den unter Punkt 3.2.19 beschriebenen Methoden. Die angegebenen Mengen gelten für eine Präparation von 1×10^6 Zellen/ml, bei Zellzahlen von $2-3 \times 10^6$ Zellen/ml wurden alle Volumina verdoppelt.

Der Zellrasen (75 cm² Kulturflasche) wurde zweimal mit 5 ml TBS-Puffer gewaschen, nach der Zugabe von 10 ml TBS-Puffer mit einem Zellschaber abgelöst und die Zellzahl bestimmt (3.2.19.4). Die Zellen wurden 5 min bei 2.900 rpm (1.500 g) sedimentiert, mit TBS-Puffer eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und die Zellsuspension à 1 ml in Eppendorfgefäße aliquotiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden durch 15sekündige Zentrifugation in der Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand abgezogen. Nach der Resuspension in 400 µl eiskaltem MKE-A-Puffer ließ man die Zellen 15 min auf Eis schwellen. Zur partiellen Lyse der Zellmembran wurden die Proben mit 25 µl einer 10 %igen Nonidet NP-40-Lösung versetzt und 10 sec auf dem Vortexer gemischt. Das Homogenisat wurde 30 sec zentrifugiert und das Zellkernsediment in 50 µl eiskaltem MKE-C-Puffer resuspendiert. Zur Zellkernlyse wurde 15 min kräftig auf einem Schüttler durchmischt. Die Membrantrümmer wurden 15 min sedimentiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinlösung mit Centriconröhrchen (Ausschlussgrenze 3 kDa) in DNA-Bindungspuffer (3.2.17.2) umgepuffert und konzentriert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit der Methode nach Bradford (3.2.16.3) bestimmt und die Kernproteinlösung in Portionen von 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C aufbewahrt.

MKE-A-Puffer:	10	mM	HEPES pH 7,9
	10	mM	KCl
	0,1	mM	EDTA
	0,1	mM	EGTA
	1	mM	DTT
	0,5	mM	PMSF

MKE-C-Puffer:	20	mM	HEPES pH 7,9
	400	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	1	mM	EGTA
	1	mM	DTT
	1	mM	PMSF

20 x TBS-Puffer:	500	mM	Tris-HCl pH 7,4
	2,74	M	NaCl
	100	mM	KCl
	14	mM	CaCl ₂
	10	mM	MgCl ₂

nach dem Autoklavieren mit 1 M Na₂HPO₄-Stammlösung auf eine Endkonzentration von 0,6 mM Na₂HPO₄ einstellen und mit Wasser auf 1 x TBS-Puffer verdünnen.

3.2.16.2 Isolierung von Zellkernen und Extraktion von Kernproteinen aus Gewebe

Die Isolierung der Kernproteine aus Gewebe erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Gorski et al. (1986; Stuempfle et al., 1996).

15 g Gewebe wurden mit dem Skalpell zerkleinert und in 30 ml Homogenisierungs-Puffer aufgenommen. Die Homogenisierung erfolgte zunächst mit dem Ultra Turrax und anschließend mit einem elektrisch betriebenen Teflon-Glas-Homogenisator. Das Homogenat wurde über 10 ml Homogenisierungs-Puffer als Saccharosebett in SW28 Zentrifugenröhrchen geschichtet und für 30 min bei 24.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellkernsedimente wurden in 10 ml Kernlyse-Puffer resuspendiert und mit einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Zur Fällung des Chromatins wurde der Lösung unter Rühren tropfenweise 1/10 des Volumens 4 M Ammoniumsulfatlösung zugegeben und weitere 30 min bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Das Chromatin wurde durch Ultrazentrifugation im Ti60-Rotor bei 35.000 rpm für 60 min sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Fällung der Kernproteine spatelspitzenweise 0,3 g pro 1 ml festes Ammoniumsulfat unter Rühren zugegeben. Der Fällungsansatz wurde für weitere 30 min unter langsamen Rühren auf Eis inkubiert. Die Kernproteine wurden im Ti60-Rotor bei 35.000 rpm für 25 min sedimentiert und das Proteinsediment in 2 ml Dialyse-Puffer resuspendiert. Zur Entfernung des überschüssigen Salzes wurde zweimal für je 2 h gegen 1 l Dialyse-Puffer bei 4 °C dialysiert. Das Dialysat wurde in Eppendorfgefäße überführt und 5 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und die Proteinlösung mit Centriconröhrchen (Ausschlussgrenze 3 kDa) in DNA-Bindungspuffer (3.2.17.2) umgepuffert und konzentriert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit der Methode nach Bradford (3.2.16.3) bestimmt und die Kernproteinlösung in Portionen von 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C aufbewahrt.

Homogenisierungs-Puffer:	10	mM	HEPES pH 7,9
	25	mM	KCl
	1	mM	EDTA
	2	M	D(+)-Saccharose
	10	% (v/v)	Glycerin
	0,15	mM	Spermin
	0,5	mM	Spermidin
	0,5	mM	PMSF
	1	mM	DTT

Kernlyse-Puffer:	10	mM	HEPES pH 7,9
	100	mM	KCl
	3	mM	MgCl ₂
	0,1	mM	EDTA
	10	% (v/v)	Glycerin
	0,5	mM	PMSF
	1	mM	DTT

Dialyse-Puffer:	25	mM	HEPES pH 7,9
	40	mM	KCl
	0,1	mM	EDTA
	10	% (v/v)	Glycerin
	1	mM	DTT

3.2.16.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurden 200 µl 5 x Roti-Quant-Lösung in 1 ml Plastikkuvetten vorgelegt, mit 800 µl Proteinlösung gemischt und nach 5 min die Absorption des gebildeten Protein-Farbstoff-Komplexes bei 595 nm gemessen. Aus einer Eichgeraden mit BSA-Lösung bekannter Konzentration konnten die Proteinkonzentrationen durch Zuordnung der Absorptionswerte ermittelt werden.

Bradford-Färbelösung: 5 x Roti-Quant-Lösung bezogen von Roth, Karlsruhe.

3.2.16.4 DAPI-Färbung der Zellkerne

Zur Kontrolle der präparierten Zellkerne (3.2.16.1 und 3.2.16.2) wurden der Suspension 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) zugesetzt und damit die Zellkerne gefärbt. Hierfür wurden zu gleichen Teilen eine 2 µg/ml DAPI-Lösung mit einer Suspension präparierter Kerne vermischt und unter UV-Bestrahlung mikroskopiert. Intakte Kerne hatten eine sphäroide Form.

3.2.17 Band Shift-Analysen und Kompetitionstest

Band-Shift oder Gelverzögerungs-Experimente dienen dem Nachweis von spezifischen DNA-Protein-Wechselwirkungen. Hierzu wurden radioaktiv markierte DNA-Fragmente mit Kernproteinen inkubiert. Die dabei sich bildenden DNA-Protein-Komplexe wurden bei der anschließenden nativen Polyacrylamidgelelektrophorese durch das verzögerte Laufverhalten gegenüber der ungebundenen (freien) DNA sichtbar. Der Überprüfung, ob ein Band Shift durch sequenzspezifische Wechselwirkungen zwischen Protein und DNA verursacht wurde, diente der Kompetitionstest. Spezifische Komplexe zwischen radioaktiv markierter Sonden-DNA und Protein entstehen nicht mehr oder nur in deutlich abgeschwächter Form, wenn zur Proteinlösung vor der Inkubation mit der markierten Sonden-DNA ein 10-100facher molarer Überschuss an nichtmarkierter DNA homologer Sequenz (homologe Kompetitor-DNA) zugegeben wird. In diesem Fall werden während dieser Präinkubationszeit die in der Proteinlösung befindlichen sequenzspezifischen Bindungsproteine die nicht-markierte Sonden-DNA fest binden. Für die nachfolgend zugegebene markierte Sonden-DNA steht somit kein Komplexierungspartner mehr zur

Verfügung. Hingegen tritt bei der Verwendung von nichtmarkierter DNA mit einer zur markierten Sonden-DNA heterologen Sequenz keine oben beschriebene Kompetition eines DNA-Protein-Komplexes im Band Shift auf. Die Proteine haben in diesem Fall während der Präinkubationsphase keine spezifischen DNA-Bindungspartner oder es bilden sich nur schwach gebundene Komplexe aus. Nach Zugabe der DNA mit spezifischer Bindungssequenz kommt es ungehindert zur Ausbildung der Komplexe mit der markierten Sonden-DNA.

3.2.17.1 Hybridisierung von Oligonukleotiden: Herstellung von Band Shift Sonden

Einzelsträngige Oligonukleotide (3.1.14.1) wurden mit einem komplementären Strang hybridisiert, um doppelsträngige Sonden für die Bindung von Kernproteinen herzustellen.

Jeweils 75 pmol Oligonukleotide wurden mit 3 µl 10 x Annealing-Puffer gemischt und auf 30 µl Endvolumen mit Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 min bei 95 °C in einem Wasserbad inkubiert, und anschließend in ein auf 80 °C temperiertes Wasserbad gestellt. Die weitere Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte langsam über einen Zeitraum von mindestens 4 h oder über Nacht. Der Ansatz wurde bei –20 °C aufbewahrt.

10 x Annealing-Puffer:	1	M	Tris-HCl pH 7,6
	100	mM	EDTA
	2	M	KCl

Zur Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden, die als Linker (3.1.14.2) für die Insertion von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA dienen, wurden 4 µl 10 x Ligase-Puffer mit jeweils 40 pmol Oligonukleotid gemischt und mit H₂O_{bidest.} auf 40 µl Endvolumen aufgefüllt. Die Hybridisierung erfolgte dann wie oben beschrieben.

10 x Ligase-Puffer:	500	mM	Tris-HCl pH 7,5
	70	mM	MgCl ₂
	10	mM	DTT

3.2.17.2 *In vitro* DNA-Protein-Bindungsreaktion

10 pmol der hybridisierten Oligonukleotide wurden wie unter Punkt 3.2.7 beschrieben am 5'-Ende radioaktiv markiert. Die Bindungsreaktionen von DNA mit Proteinen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Reaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

4	µl	5 x BB-I Puffer
4	µl	5 x SMK Puffer
3	µl	poly (dI-dC)
3	µg	Zellkernproteinextrakt (3.2.16)
x	µl	Kompetitor-DNA
30-50	fmol	³² P-markierte DNA (6.000-8.000 cpm)

Mit Ausnahme der radioaktiv markierten DNA wurden alle Komponenten auf Eis zusammenpipettiert und 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der markierten DNA. Der Ansatz wurde weitere 30 min auf Eis inkubiert. Zur Trennung der Reaktionsprodukte schloss sich eine native Polyacrylamidgelelektrophorese an (3.2.17.3).

5 x BB-I Puffer:	20	mM	HEPES-KOH pH 7,9
	300	mM	KCl
	2	mM	MgCl ₂
	0,2	mM	EDTA
	0,1	mM	ZnCl ₂
	1	mM	DTT
	20	% (v/v)	Glycerin

5 x SMK Puffer:	12	mM	Spermidin
	12	mM	MgCl ₂
	100	mM	KCl

Poly (dI-dC)-Lösung:	0,5	µg/µl	Poly (dI-dC) in Wasser
----------------------	-----	-------	------------------------

3.2.17.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese von DNA-Protein-Komplexen

Die Reaktionsprodukte der Bindungsreaktion (3.2.17.2) wurden in einem 5 %igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Gellösung hatte folgende Zusammensetzung:

16,4	ml	30 %ige Acrylamidlösung
3,4	ml	2,5 %ige Bisacrylamidlösung
5	ml	Glycerin
20	ml	5 x Tris-Glycin-Puffer pH 8,5
54,2	ml	H ₂ O
1	ml	10 % Ammoniumperoxodisulfat
0,1	ml	TEMED

Die Gellösung wurde in eine Gelkammer mit dem Format 20 x 20 x 0,1 cm gegossen und 1 h polymerisiert. Als Laufpuffer für die Gelelektrophorese diente 1 x Tris-Glycin-Puffer (pH 8,5). Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel für 30 min bei 120 V präelektrophoretisiert. Zur Beobachtung der Elektrophorese wurden die Proben mit 5 µl 5 x Auftragspuffer versetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 160-220 V (20-25 mA) für ca. 4 h bei 4 °C. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel 10 min in einer

Lösung aus 10 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure fixiert. Das Gel wurde auf Whatman 3 MM-Papier transferiert, mit Haushaltsfolie abgedeckt und bei 80 °C für 40-60 min unter Vakuum vollständig getrocknet. Zum Nachweis der radioaktiven DNA wurde in einer lichtdichten Exponierbox ein Röntgenfilm auf das getrocknete Gel aufgelegt und bei –80 °C 1-7 Tage exponiert.

5 x Tris-Glycin-Puffer:	250	mM	Tris-Base
	1,9	M	Glycin
	10	mM	EDTA
			pH-Wert mit konzentrierter HCl auf pH 8,5 einstellen

5 x Auftragspuffer:	50	% (v/v)	Glycerin
	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,05	% (w/v)	Xylencyanol FF
			in 1 x BB-I/SMK-Puffer ansetzen

3.2.18 DNase I Footprinting Analyse

DNase I Footprinting Analysen dienen der basengenauen Lokalisation von DNA-Bindungssequenzen innerhalb eines relativ langen DNA-Fragmentes von 100-300 bp. Diese Methode wurde modifiziert nach Galas und Schmitz (1978) durchgeführt.

Für die Footprint-Analyse werden einseitig endmarkierte DNA-Fragmente in Ab- und Anwesenheit von Kernproteinen mit DNase I inkubiert, wobei durch geeignete Einstellung der DNase I Konzentration einmal pro Molekül gespalten wird. In Abwesenheit von Kernproteinen ergibt sich somit eine kontinuierliche DNA-Leiter. An den Bindungsstellen von sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren ist das DNA-Fragment vor der Hydrolyse durch DNase I geschützt. Die Hydrolyseprodukte werden anschließend in einem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt. Die Proteinbindestellen werden als Lücken (Footprints) in der DNA-Leiter sichtbar, da die entsprechenden Fragmente in der Hydrolysereaktion durch die schützende Proteinbindung nicht entstehen können. Diese Stellen können dann basengenau anhand einer mit auf dem Polyacrylamidgel aufgetragenen Sequenzierreaktion bestimmt werden.

Die Bindungsreaktion zwischen ^{32}P -endmarkierten DNA-Fragmenten und Kernproteinen wurde in 50 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Die Herstellung des hierbei einseitig endmarkierten DNA-Fragmentes ist unter Punkt 3.2.7. und 3.2.9 beschrieben. Die Reaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

12,5	µl	4 x Bindungspuffer
2	µl	Poly (dI-dC) (0,5 µg/µl)
x	µl	H ₂ O _{bidest.}
50-250	µg	Kernproteine (3.2.16)
x	µl	endmarkiertes DNA-Fragment (90.000 cpm)

Zunächst wurden 4 x Bindungspuffer, Kompetitor Poly (dI-dC) sowie in Ansätzen mit Kernproteinen diese zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das radioaktiv markierte DNA-Fragment zugegeben und der Ansatz für 40 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl MgCl₂/CaCl₂-Puffer wurden die Ansätze mit 6 µl DNase I Stammlösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 s bis 30 s wurde die Nukleaseaktivität durch Zugabe von 100 µl Stopp-Puffer, der zuvor auf 37 °C temperiert wurde, beendet. Zur kompletten Hydrolyse der Proteinkomponenten wurde nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C 2 µl Proteinase K und 1,1 µl 100 mM CaCl₂ zugegeben und weitere 2 h bei 50 °C inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend im SpeedVac-Konzentrator auf ein Volumen von 50 µl eingengt und über das QIAquick Nucleotid Removal Kit (3.2.5.4) gereinigt. Das DNA-Eluat wurde im Vakuum getrocknet und zweimal mit eiskaltem 80 %igen Ethanol gewaschen. Nach erneutem Trocknen im Vakuum wurde das DNA-Sediment in 3 µl Wasser und 3 µl Auftragspuffer aufgenommen. Die Proben wurden in einem 6 %igen denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gel (3.2.12.2) analysiert. Um die DNase I Fragmente der zugrunde liegenden Sequenz zuordnen zu können, wurde parallel eine DNA-Sequenzierung des DNA-Fragmentes durchgeführt (3.2.11.1) und mit auf das Gel aufgetragen. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel 7-10 Tage bei -80 °C autoradiographiert.

4 x Bindungspuffer:	100	mM	HEPES pH 7,6
	240	mM	KCl
	0,4	mM	EDTA
	20	mM	MgCl ₂
	0,04	mM	ZnCl ₂
	4	mM	DTT
	4	% (v/v)	Glycerin

MgCl ₂ /CaCl ₂ -Puffer:	5	mM	MgCl ₂
	0,25	mM	CaCl ₂

Stopp-Puffer:	100	mM	Tris-HCl pH 7,9
	100	mM	NaCl
	10	mM	EDTA
	1	% (w/v)	SDS

DNase I Stammlösung:	3,5	ng/µl	DNase I
	135	mM	NaCl
	15	mM	Natriumcitrat pH 6,5
	50	% (v/v)	Glycerin

Proteinase K Stammlösung:	10	µg/µl	Proteinase K
Auftragspuffer:	97,5	% (v/v)	Formamid (deionisiert)
	10	mM	EDTA pH 7,5
	0,3	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,3	% (w/v)	Xylencyanol FF

3.2.19 Kultivierung von Säugerzellen

Alle in der Zellkultur verwendeten Materialien, die mit Zellen in Berührung kamen oder unter der Sterilbank gehandhabt wurden, wurden entweder durch feuchte Hitze (Autoklavieren) oder trockene Hitze (180 °C Trockenschrank) sterilisiert, mit 45 % (v/v) Isopropanol oberflächlich behandelt oder steril bezogen. Alle mit Zellmaterial in Kontakt getretenen Materialien oder Geräte wurden entweder mit Alkohol desinfiziert oder durch Autoklavieren sterilisiert.

Chemikalien für die Zellkultur wurden in zellkulturgetesteter oder in der höchstmöglich erhältlichen Qualität verwendet. Die Sterilfiltration wurde mit Filtereinheiten einer Porengröße von 0,2 µm durchgeführt.

3.2.19.1 Herstellung von Medien für die Zellkultivierung

Alle Basalmedien wurden entweder als fertiges Flüssigmedium oder in Form von Trockenpulver bezogen. Bei der Herstellung der Medien aus Trockenpulver wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Zur Sterilisierung wurden die Medien durch Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert und die Sterilität der Medien durch Inkubation bei 37 °C für 72 h überprüft. Zeigten die Medien keine Kontaminationen, wurden sie bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.19.2 Kryokonservierung und Auftauen von Säugerzellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden von den Zellen Dauerkulturen angelegt. Die zu 70-80 % konfluenten Zellen wurden gewaschen, von der Kulturfläche abgelöst, in 10 ml Kulturmedium suspendiert und in ein 14 ml Greiner-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden in der Labofuge 5 min bei 110 x g sedimentiert. Während der Zentrifugation wurde die Zellzahl bestimmt und das Sediment in einem entsprechenden Volumen Serum mit 7,5 % DMSO resuspendiert, so dass sich eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml ergab. Als Serum wurde die dem Kulturmedium entsprechende Sorte verwendet. Die zu je 1 ml in Kryoröhrchen portionierten Zellen wurden für 18 h bei -80 °C in einer Styroporbox eingefroren, bevor sie in der Gasphase über flüssigem Stickstoff bei -120 °C gelagert wurden.

Beim Auftauen der Zellen muss das DMSO rasch entfernt werden. Die unter flüssigem Stickstoff aufbewahrten Dauerkulturen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, die Zellen sofort mit 1 ml vorgewärmten Kulturmedium gemischt und in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt, in dem 8 ml Medium vorgelegt waren. Die Zellen wurden 5 min bei 110 x g sedimentiert, in Kulturmedium resuspendiert, in eine Kulturflasche überführt und in die Kulturgefäße ausgesät.

3.2.19.3 Beschichtung von Kulturgefäßen

Für die Kultivierung adhärent wachsender Zellen wurden die Kulturgefäße beschichtet. Die Zelllinie BHK 21 wurde auf gelatinebeschichteten Zellkulturgefäßen kultiviert. Zur Beschichtung der Zellkulturgefäße wurden diese mit steriler 1 %iger Gelatinelösung bedeckt und die Lösung 15 min bei Raumtemperatur auf den Gefäßen belassen. Die Gelatinelösung wurde abgesaugt und die Zellkulturgefäße einmal mit PBS gewaschen.

Zellkulturgefäße zur Kultivierung der Zelllinie PC-12 wurden mit Rattenschwanzkollagen beschichtet. Hierzu wurde der Boden der Zellkulturgefäße mit 0,01 %iger Kollagenlösung bedeckt und über Nacht bei 4 °C auf diesen belassen. Die Kollagenlösung wurde abgesaugt und die Kulturgefäße bei 4 °C gelagert. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Zellkulturgefäße einmal mit PBS gewaschen.

1 % (w/v) Gelatinelösung:	1 g Gelatine in 100 ml Milli-Q-Wasser suspendieren, durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C und 2 bar lösen und bei Raumtemperatur lagern.
---------------------------	--

0,01 % (w/v) Kollagenlösung:	5 mg Rattenschwanz-Kollagen Typ I in 5 ml 0,1 M Essigsäure lösen. Die 0,1 %ige Stammlösung mit Milli-Q-Wasser 1 : 10 verdünnen und bei 4 °C lagern.
------------------------------	---

3.2.19.4 Bestimmung der Zellzahl durch den Trypanblau-Ausschlusstest

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurden diese mit Trypanblau „angefärbt“. 50 µl einer Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblaulösung gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und ausgezählt. Während vitale Zellen in der Lage sind den Farbstoff auszuschließen und im mikroskopischen Bild hell erscheinen, nehmen tote Zellen den Farbstoff auf und sind tiefblau gefärbt. Es wurden mindestens 4 Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen} \cdot \text{ml}^{-1} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Zahl der Großquadrate}} \cdot 2 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$$

Trypanblau-Lösung: 0,5 % (w/v) Trypanblau
 0,9 % (w/v) NaCl
 in PBS lösen und sterilfiltrieren.

3.2.19.5 Kultivierung und Subkultivierung der Fibroblastenzelllinie BHK 21

Die BHK 21 Zellen (3.1.13) wurden in gelatinebeschichteten Kulturgefäßen (3.2.19.3) bei 37 °C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Luftatmosphäre kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 1-2 Tage gewechselt und bei erreichter Konfluenz wurden die Zellen mit einer Teilungsrate von 1:10 bis 1:20 passagiert. BHK 21 Zellen wurden mit Dispase passagiert. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Dispaselösung (2,4 U/ml; ~ 1 ml für eine 25 cm²-Kulturflasche) bedeckt. Nach einer Inkubation von ca. 5 min bei 37 °C lösten sich die Zellen vom Flaschenboden ab. Die Zellsuspension wurde abgesaugt, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und auf 10 ml Basalmedium aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 110 x g wurden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen, gezählt und in neue Kulturgefäße ausgesät. BHK 21 Zellen wachsen sehr schnell und erreichen Zelldichten von über 2 x 10⁵ Zellen/cm². Bedingt durch das schnelle Wachstum und einen sehr aktiven Metabolismus säuern die Zellen das Medium relativ schnell an. Wurde bei einer sub- oder konfluenten Kultur das Medium für 2 Tage auf den Zellen belassen, starb die Kultur schnell ab.

Kulturmedium: 89 % (v/v) DMEM-Basalmedium
 10 % (v/v) FCS
 1 % (v/v) 200 mM L-Glutamin

3.2.19.6 Kultivierung und Subkultivierung der Phäochromocytom-Zelllinie PC-12

Die PC-12 Zellen (3.1.13) wurden in kollagenbeschichteten Kulturgefäßen (3.2.19.3) bei 37 °C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Luftatmosphäre kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und bei erreichter Konfluenz wurden die Zellen mit einer Teilungsrate von 1:5 bis 1:10 passagiert. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Kulturmedium bedeckt. Der Zellrasen wurde mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und Kulturmedium auf 10 ml Endvolumen zugegeben. Die Zellen wurden 5 min bei 110 x g sedimentiert und das Zellsediment in frischem Kulturmedium aufgenommen, eventuell gezählt und in neue Kulturgefäße ausgesät. PC-12 Zellen haben die Eigenschaft, in Kultur kleine Zellhaufen zu bilden. Um einzelne Zellen zu erhalten, wurde die Zellsuspension vor der Aussaat in neue Kulturflaschen durch eine Spritze mit einer 0,9 mm Kanüle zerteilt. Die Differenzierung der PC-12 Zellen zu sympathischen Neuronen wurde durch Zugabe von 50 ng Nerve

Growth Factor pro ml Kulturmedium erreicht. Zur Erhaltung des Differenzierungszustandes wurde ein täglicher Medienwechsel unter NGF Zugabe durchgeführt.

Kulturmedium:	85	% (v/v)	DMEM-Basalmedium (4,5 g/l D-Glucose, 580 mg/l L-Glutamin)
	10	% (v/v)	Pferdeserum, hitzeinaktiviert
	5	% (v/v)	fötales Kälberserum

NGF-Stammlösung:	100	µg/ml	NGF 2,5S, Maus, nativ
------------------	-----	-------	-----------------------

3.2.19.7 Kultivierung und Subkultivierung der Neuroblastomazelllinie Neuro-2a

Die adhärent wachsende Zelllinie Neuro-2a (3.1.13) wurde bei 37 °C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Luftatmosphäre kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und bei erreichter Konfluenz wurden die Zellen mit einer Teilungsrate von 1:5 passagiert.

Neuro-2a Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturfläche abgelöst. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, der Boden des Kulturgefäßes einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt. Die Lösung wurde 1-5 min auf den Zellen belassen und das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop verfolgt. Das Ablösen der Zellen wurde durch sanftes Aufschlagen des Kulturgefäßes auf der Kante beschleunigt. Die Zellsuspension wurde abgesaugt, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und auf 10 ml Basalmedium aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 110 x g wurden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen, eventuell gezählt und in neue Kulturgefäße ausgesät.

Kulturmedium:	90	% (v/v)	MEM-Basalmedium (2 mM L-Glutamin, 0,1 mM nichtessentielle Aminosäuren, 1,5 g/l Natriumbicarbonat, 1 mM Natriumpyruvat)
	10	% (v/v)	fötales Kälberserum

3.2.19.8 Kultivierung und Subkultivierung der Neuroblastomazelllinie SK-N-SH

Die adhärent wachsende Zelllinie SK-N-SH (3.1.13) wurde bei 37 °C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Luftatmosphäre kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und bei erreichter Konfluenz wurden die Zellen mit einer Teilungsrate von 1:5 bis 1:10 passagiert. Die Subkultivierung erfolgte wie unter Punkt 3.2.19.7 beschrieben.

Kulturmedium:	90	% (v/v)	MEM-Basalmedium (2 mM L-Glutamin)
	10	% (v/v)	fötales Kälberserum

3.2.20 Transfektion von Säugerzellen

Bei allen Transfektionen wurden ausschließlich vitale Zellen verwendet, die sich zum Zeitpunkt der Zellernte in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Die Zellen wurden 24-48 h vor der Transfektion mit einer Aussaatdichte von $1-3 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät und bei 70-80 % Konfluenz transfiziert. Die für die Transfektion verwendete Plasmid-DNA wurde über Qiagen-Säulen gereinigt (3.2.4.2).

3.2.20.1 Lipofektion der BHK 21 Zellen mit DDAB

3.2.20.1.1 Herstellung der Liposomen

Kationische Liposomen wurden nach einer beschriebenen Modifikation (Teifel und Friedl, 1995) der Vorschriften von Felgner et al. (1987) und Rose et al. (1991) hergestellt.

0,4 mg DDAB und 1 mg α -Phosphatidylcholin wurden in 1 ml Milli-Q-Wasser suspendiert. Die Suspension wurde für mindestens 5 min im Ultraschallbad behandelt. Das Wasserbad wurde hierbei mit Eis gekühlt, um eine Überhitzung der Lösung zu vermeiden. Die Bildung der Liposomen wurde als beendet angesehen, wenn die Lösung optisch klar erschien. Die Liposomen wurden vor jeder Transfektion frisch hergestellt.

3.2.20.1.2 Lipofektion der BHK 21 Zellen

Die BHK 21 Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit einer Aussaatdichte von 3×10^4 Zellen pro Kavität einer 24-Loch-Platte ausgesät und kultiviert (3.2.19.5).

In ein Eppendorf-Gefäß wurden 500 μ l serumfreies Kulturmedium vorgelegt, 4 μ g Plasmid-DNA zugegeben und mit 8 μ l Liposomenpräparat (3.2.20.1.1) durch Invertieren gemischt. Jeder Transfektionsansatz wurde achtfach ausgeführt. Die Bildung der DNA-Liposomen-Komplexe erfolgte während einer 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Das Kulturmedium wurde von den Zellen abgezogen, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen, der Transfektionsmix zugegeben und die Zellen 5 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Nach einem Medienwechsel wurden die Zellen bis zur Auswertung für weitere 43 h kultiviert. Als Kontrollen wurden die Zellen in parallelen Ansätzen in serumfreiem Medium ohne DNA und Liposomen, nur mit Liposomen und mit 1 μ g Plasmid-DNA (nicht mit Liposomen komplexiert) inkubiert.

3.2.20.2 Transfektion mit kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien

Die Zelllinien PC-12, Neuro-2a und SK-N-SH wurden mit kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien transfiziert.

3.2.20.2.1 Transfektion der Neuro-2a und SK-N-SH Zellen mit FuGENE™ 6

Die Zelllinien Neuro-2a (3.1.13) und SK-N-SH (3.1.13) wurden mit dem kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenz FuGENE™ 6 (Boehringer Mannheim) transfiziert. Dieses nicht-liposomale Transfektionsreagenz garantierte bei diesen Zelllinien hohe Transfektionsraten, minimale Cytotoxizität und die Transfektion konnte in Anwesenheit von Serum durchgeführt werden.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro Kavität einer 6-Loch-Platte ausplattiert und kultiviert (3.2.19.7 und 3.2.19.8). In einem Eppendorf-Gefäß wurden 94 µl serumfreies Kulturmedium vorgelegt, 6 µl FuGENE™ 6 Transfektionsreagenz in das Medium pipettiert und 5 min bei RT inkubiert. In ein zweites Eppendorf-Gefäß wurden 3 µg Plasmid-DNA (Promotortestplasmid und Kontrollvektor pRL-TK im Verhältnis 10:1) jeweils einer Stammlösung mit einer Konzentration von 0,5 µg/µl gegeben und tropfenweise das verdünnte Transfektionsreagenz hinzugefügt. Die Transfektionslösung wurde durch saches Antippen des Reaktionsgefäßes gemischt und zur Bildung der DNA-Transfektionsreagenz-Komplexe 15 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit frischem Kulturmedium versehen, die Transfektionslösung gleichmäßig in der Kavität verteilt und nach den unter 3.2.19.7 und 3.2.19.8 beschriebenen Bedingungen für 48 h kultiviert. Als Kontrollen wurden jeweils ein Reaktionsansatz ohne Zugabe von Transfektionsreagenz, ohne DNA mit Transfektionsreagenz und ohne DNA und Transfektionsreagenz inkubiert.

3.2.20.2.2 Transfektion der PC-12 Zellen

Die Zelllinie PC-12 (3.1.13) wurde mit dem kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenz SuperFect (Qiagen) transfiziert. Die Transfektion der differenzierten Zellen erfolgte nach einer Vorschrift von Kelly-Spratt (1998).

Die Zellen wurden 5 Tage vor der Transfektion mit 50 ng pro ml Kulturmedium stimuliert und ein Tag vor der Transfektion mit einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro Kavität einer 6-Loch-Platte ausplattiert und kultiviert (3.2.19.6). Zur Bildung der SuperFect-DNA-Komplexe wurden 3 µg Plasmid-DNA (pCMVβ oder Promotortestplasmid und Kontrollvektor pRL-TK im Verhältnis 10:1) mit 15 µl SuperFect Reagenz versetzt und mit serumfreiem DMEM ein Endvolumen von 100 µl eingestellt. Die Komplexbildung erfolgte während einer 10minütigen Inkubation bei RT. Zu dem Transfektionsmix wurden 600 µl Kulturmedium (mit 0,05 % Serumanteil) gegeben, gleichmäßig auf die Zellen verteilt und 3 h im Inkubator belassen. Anschließend wurde die Transfektionslösung entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und nach den unter 3.2.19.6 beschriebenen Bedingungen mit NGF für 48 h kultiviert. Als Kontrollen wurden jeweils ein Reaktionsansatz ohne Zugabe von Transfektionsreagenz, ohne DNA und ohne Zugabe von DNA und Transfektionsreagenz mitgeführt.

3.2.20.2.3 Nachweis der β -Galactosidaseaktivität mittels X-gal-Färbung und Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zum Nachweis der Aktivität des Reporterenzym β -Galactosidase wurde der Zellrasen mit dem Substrat X-gal gefärbt (Sambrook et al., 1989). X-gal wird von der β -Galactosidase hydrolysiert, das freigesetzte Indolderivat ist im mikroskopischen Bild als blauer Niederschlag zu erkennen. Die Effizienz der Transfektion ließ sich nach Auszählung β -Galactosidase positiver Zellen quantifizieren.

Der Zellrasen wurde mit PBS gewaschen und für 10 min bei RT mit 500 μ l Glutaraldehydlösung fixiert. Die Zellen wurden dreimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen, wobei das PBS beim zweiten Waschschrift für 10 min auf den Zellen verblieb. Der Zellrasen wurde mit Reaktionslösung in der 1 mg/ml X-gal enthalten war, bedeckt und je nach Stärke der Färbung 3-24 h bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden bis zu 7 Tagen bei 4 °C gelagert.

Nach der Färbung wurde durch Auszählung der β -Galactosidase positiven (blauen) Zellen im mikroskopischen Bild die Transfektionseffizienz bestimmt. Die Transfektionseffizienz wurde hier als relativer Anteil positiver Zellen zur ausgesäten Zellzahl berechnet.

Glutaraldehydlösung:	0,05 % (v/v)	Glutaraldehyd in PBS
X-gal-Stammlösung:	20 mg/ml	X-gal in DMF
Reaktionspuffer pH 8,0:	20 mM	$K_3Fe(CN)_6$
	20 mM	$K_4Fe(CN)_6$
	1,5 mM	$MgSO_4$ in PBS lösen, sterilfiltrieren.

3.2.20.3 Aufschluss von Säugerzellen

Zur Messung der Reportergenaktivität (siehe Punkt 3.2.20.4) transfizierter Zellen wurden die Zellen mit einer Detergenzlösung nach Herstellerangaben (Promega, 1999) aufgeschlossen.

Transfizierte Zellen wurden 48 h nach der Transfektion einmal mit PBS-Puffer gewaschen und die Zellen mit einem entsprechenden Volumen Lyse-Puffer (1 x PL-Puffer) bedeckt. Für die verwendeten Kulturplatten wurden folgende Volumina PL-Puffer eingesetzt:

6-Loch-Platte	500 μ l
12-Loch-Platte	250 μ l
24-Loch-Platte	100 μ l

Nach der Zugabe des Lyse-Puffers wurden die Kulturplatten auf einem Schüttler 15 min geschüttelt, die Zellysate in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur Messung der Reportergenaktivität bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.20.4 Messung der Reportergenaktivitäten

Die Bestimmung der Luciferase-Aktivitäten transfizierter Zellen erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Dual LuciferaseTM Reporter Assay System (Promega, 1999).

Aufgrund ihres unterschiedlichen evolutionären Ursprungs haben die Luciferasen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* und die der maritimen Pflanze *Renilla reniformis* verschiedene Enzymstrukturen und Substraterfordernisse. Diese ermöglichen die separate Messung der beiden Luciferase-Aktivitäten nach erfolgter Co-Transfektion in ein und demselben Zellextrakt. Für die Aktivitätsmessung wurde das Dual-LuciferaseTM Reporter Testsystem der Firma Promega verwendet (Promega, 1999). In diesem dualen Testsystem wurde zunächst die differentiell regulierte Luciferase-Expression (*Photinus pyralis*) gemessen und im Anschluss daran ein Quencher/Substrat-Gemisch zugegeben, welches die Messung der konstitutiv exprimierten zweiten Luciferase (*Renilla reniformis*) erlaubt.

Die Luciferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* ist ein monomeres 61 kDa Protein, das unter Lichtemission die Oxidation von Luciferin in Gegenwart von ATP und Sauerstoff zu Oxyluciferin, AMP und Kohlendioxid katalysiert.

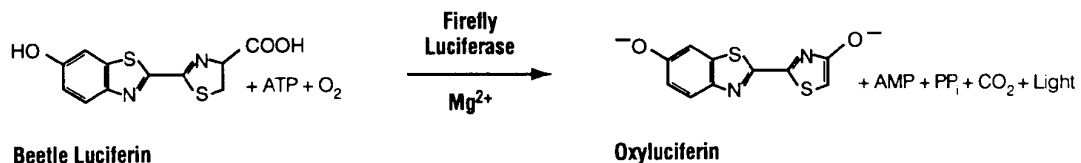


Abb. 3.6: Biolumineszenzreaktion katalysiert durch die Luciferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*

Die Luciferase der *Renilla reniformis* ist ein monomeres 36 kDa Protein. Die durch diese Luciferase katalysierte Lumineszenz-Reaktion verwendet Coelenterazin und Sauerstoff als Substrat.

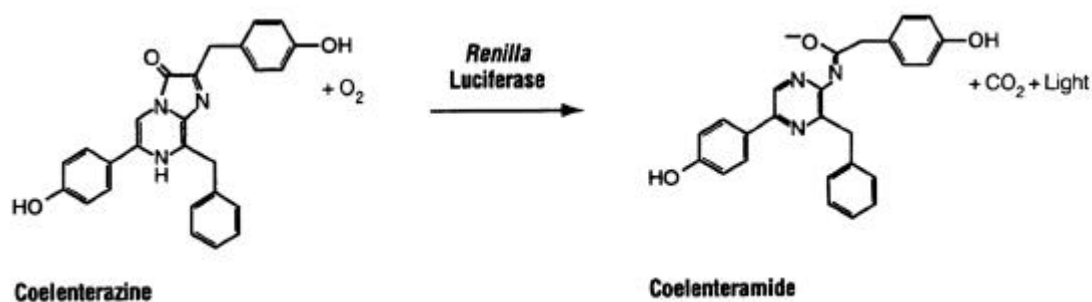


Abb. 3.7: Biolumineszenzreaktion katalysiert durch die Luciferase *Renilla reniformis*

Die Lichtemission der Biolumineszenzreaktionen wurde in einem Luminometer (BioOrbit 1250) quantifiziert. Dessen linearer Messbereich wurde mit rekombinanter Luciferase bestimmt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe der rekombinanten Luciferase von 10^{-10} bis 10^{-20} mol in PL-Puffer mit 1 mg/ml Gelatine hergestellt und die Lichtemission durch Umsetzung mit 100 μl Luciferase Assay Reagenz bestimmt. Der lineare Messbereich des Luminometers lag zwischen 10^{-12} bis 10^{-17} mol rekombinanter Luciferase.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung repetitiver Sequenzen im Gen 83.5

Das Genom eines Organismus kann bis zu 50 % aus repetitiven Elementen, sogenannten *Interspersed Repetitive Sequences*, bestehen. Einige dieser repetitiven Sequenzen sind artspezifisch, andere sind in verschiedenen Organismen vertreten. Zwischen den unterschiedlichen Arten von *Interspersed Repetitive Elements* sind in eukaryontischen Genomen hauptsächlich die *Long Interspersed Elements* (LINEs) und *Short Interspersed Elements* (SINEs) vertreten. Die SINE-Familien sind die häufigsten Wiederholungselemente in eukaryontischen Genomen. Sie gehören zu den mittelrepetitiven Sequenzen und sind in zehn- bis mehreren hunderttausend Kopien pro Genom vertreten. SINEs stammen von Transkripten der RNA-Polymerase III, also von mRNAs, die für kleine, nichttranslatierte RNAs wie der 7S RNA oder der tRNA codieren, ab (Makalowski, 1995). Allen bekannten SINE-Familien fehlt die codierende Kapazität, aber sie enthalten den RNA Polymerase III Promotor und das A-reiche 3'-Ende. SINE-Elemente vermehren sich innerhalb der Genome über RNA-Intermediate in einem Prozess der Retroposition. Die Integration in das Genom kann in beiden Orientierung erfolgen und sie kann in jeden Bereich des Genoms wie Exons, Introns oder intergenischen Bereichen erfolgen. Somit können sie Teil des offenen Leserahmens werden, Funktionen innerhalb regulatorischer Regionen übernehmen oder in der Entstehung von strukturell und funktionell neuen Genen beteiligt sein.

Im Genom des Schweins ist die Familie der porcinen SINE-Sequenzen mit einer Kopienzahl von 10^5 vertreten (Frengen et al., 1991). Für die Analyse des Gens 83.5 auf SINE-Sequenzen wurde ein Datenbankabgleich mit der längsten porcinen SINE-Sequenz von 328 Basen (Frengen et al., 1991) durchgeführt. Verwendet wurde das Programm BLAST 2 der NCBI (Altschul et al., 1997). Interessanterweise kommen große Abschnitte der SINE-Sequenz im Gen 83.5 mehrmals und in beiden Orientierungen und beiden Strängen vor. Die Positionen dieser Sequenzbereiche ist in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Die SINE-Sequenzen befinden sich alle in nichtcodierenden Sequenzen des Gens 83.5 und die Mehrzahl der Elemente in den Kontrollregionen *tmp* und *sp* 83.5. In der Promotorregion *tmp* 83.5 liegen insgesamt sechs SINE-Sequenzen (Tab. 4.1, Nr. 1 bis 6) und in der Promotorregion *sp* 83.5 vier (Tab. 4.1, Nr.10 bis 14). Darüber hinaus sind 166 nt des bis zu diesem Zeitpunkt bekannten 304 nt langen individuellen 5'-Bereichs der mRNA *sp* 83.5 SINE-Sequenzen. Das SINE-Sequenzen Bestandteil von Promotoren sind und somit die Effizienz der Transkription beeinflussen wurde bereits bei verschiedenen Globinengen beschrieben (Makalowski, 1995).

Tab. 4.1: Porcine SINE-Sequenzen im Gen 83.5

Nr.	Position	DNA-Strang	Homologie [%]
1	1 – 94	-	85
2	1990 – 2217	-	85
3	3267 – 3410	-	83
4	3599 – 3816	-	83
5	4115 – 4273	-	93
6	4327 – 4507	+	85
7	5967 – 6241	+	79
8	7763 – 7964	-	87
9	8890 – 9106	+	82
10	10393 – 10624	-	83
11	11211 – 11435	+	83
12	13237 – 13422	-	80
13	13748 – 13986	-	85
14	14619 – 14853	-	80
15	15463 – 15653	-	77
16	16188 – 16364	-	79
17	19364 – 19581	+	90

4.2 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes

Northern-Blot- und RT-PCR-Analysen zeigten, dass von dem Gen 83.5 zwei Transkripte mRNA *tmp* 83.5 und mRNA *sp* 83.5 gebildet werden, die sich in ihrem 5'-Ende unterscheiden (Bangsow, 1996 und Schepelmann, 1996). Die Zuordnung der mRNA-Sequenzen zu der genomischen Sequenz des Gens 83.5 ergab, dass der individuelle 5'-Sequenzbereich der mRNA *sp* 83.5 einer Teilsequenz des Introns II entsprach (siehe Abb. 15; Bangsow, 1996). Die beiden Transkripte sind demnach nicht Produkte alternativen Spleißens, sondern stehen unter der Kontrolle verschiedener Promotoren. Der Transkriptionsstartpunkt kennzeichnet den Übergang von Promotor zu Strukturgen. Das Strukturgen, das in Exons und Introns unterteilt ist, erstreckt sich vom Startpunkt der Transkription in 3'-Richtung (stromabwärts). Es wird im Vorgang der Transkription in eine Prä-mRNA (hnRNA) umgeschrieben. Aus dieser werden dann im Prozess des Spleißens die Introns entfernt, so dass die reife mRNA entsteht, die sich nur aus codierenden Sequenzen (Exons) zusammensetzt. Vom Transkriptionsstartpunkt in 5'-Richtung (stromaufwärts) erstreckt sich der Promotor. Dieser reguliert sowohl die zeitliche als auch die räumliche Transkription des Strukturgens. Der Transkriptionsstartpunkt lässt sich indirekt über das 5'-Ende der mRNA bestimmen, das diejenige DNA-Sequenz darstellt an der die Transkription beginnt. Für die mRNA *tmp* 83.5 wurde der Transkriptionsstartpunkt bereits bestimmt (Perl, 1996) und sollte nach derselben Methode (*Primer Extension*) für die mRNA *sp* 83.5 ermittelt werden.

4.2.1 Prinzip der *Primer Extension*

Die Methode der *Primer Extension* (Maniatis et al., 1989) wurde von P.K. Ghosh und S.M. Weissman 1978 erstmals beschrieben und beruht auf der enzymatischen Verlängerung eines zu der untersuchenden mRNA komplementären Oligonukleotidprimers entlang einer RNA-Matrize. Das eingesetzte Oligonukleotid wird aus dem 5'-Bereich der bekannten cDNA-Sequenz abgeleitet und am 5'-Ende radioaktiv markiert, damit die Reaktionsprodukte im Autoradiogramm sichtbar gemacht werden können. Anschließend wird das Oligonukleotid mit der RNA hybridisiert und der Primer durch das Enzym Reverse Transkriptase an der RNA-Matrize verlängert. Die resultierende cDNA endet am 5'-Ende der RNA-Matrize, das den Startpunkt der Transkription bildet. Nach Abbau der RNA mit dem Enzym RNase A lässt sich die Größe der erhaltenen radioaktiv markierten cDNA durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmen, indem man parallel zu den *Primer Extension*-Ansätzen eine Sequenzierreaktion elektrophoretisch trennt. Die Größe des cDNA-Produkts gibt die Distanz zwischen dem 5'-Ende des Oligonukleotidprimers und dem 5'-Ende der mRNA an. Die Position des Transkriptionsstartpunkts kann nach dieser Methode mit einer Genauigkeit von plus/minus einem Nukleotid bestimmt werden. Das Prinzip der *Primer Extension* ist in der Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

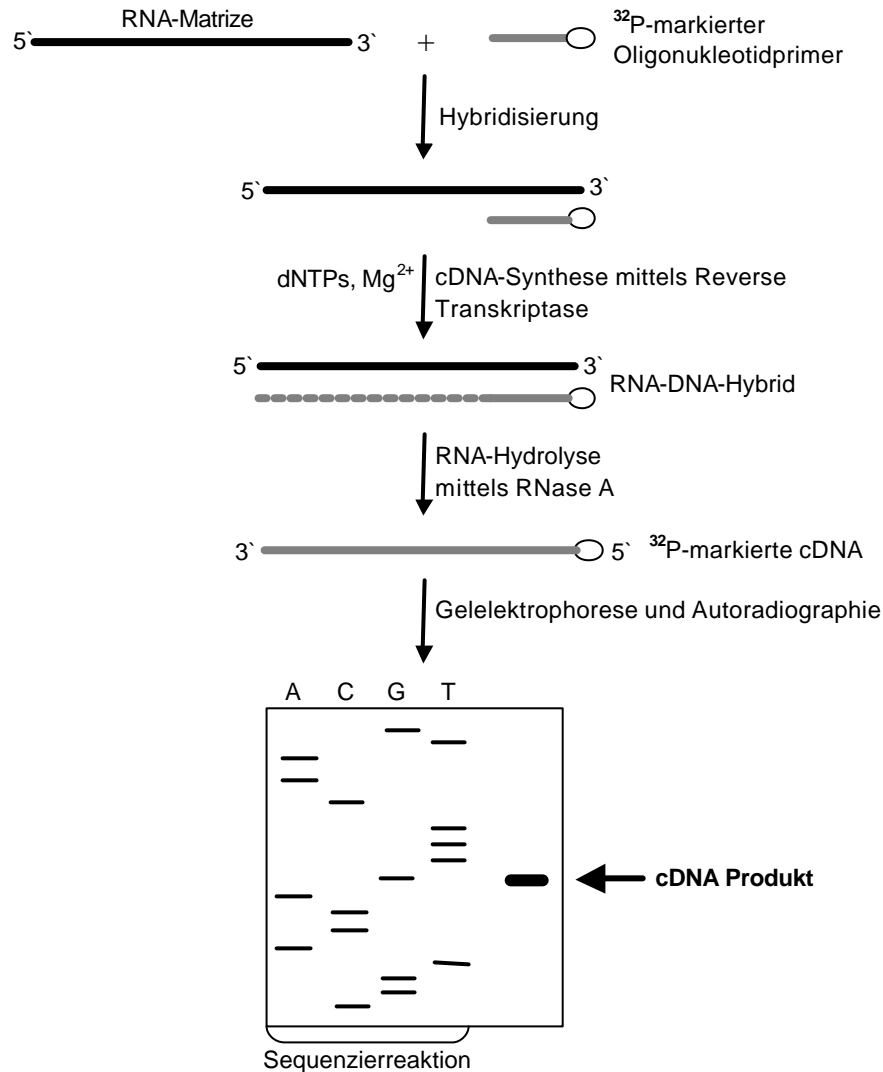


Abb. 4.1: Prinzip der *Primer Extension*. Erläuterung im Text.

4.2.2 Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus Schweinegehirn

Ausgangspunkt für die Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts ist die gesamte RNA-Population eines Gewebes oder Organs, von dem bekannt ist, dass in diesem das zu untersuchende Transkript häufig gebildet wird. Im Falle des gehirnspezifisch exprimierten Gens 83.5 ist hierfür Gesamthirn gut geeignet (Bangsow et al., 1998).

Die gesamtzelluläre RNA wurde aus schlachtfresh bezogenen Gehirnen des Schweins nach dem unter 3.2.14 beschriebenen Guanidiniumthiocyanat/Phenol Extraktionsverfahren isoliert (Chomczynski und Sacchi, 1987). Die Ausbeuten lagen durchschnittlich bei 0,5 mg pro Gramm eingesetztem Gewebe. Die Reinheit der RNA wurde durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums von 220-300 nm und dem Quotienten A_{260}/A_{280} bestimmt (3.2.13). Der Quotient aus den Absorptionswerten entsprach mit $A_{260}/A_{280} = 1,7$ den Erwartungen.

In der Abbildung 4.2 ist das Absorptionsspektrum exemplarisch für eine erhaltene RNA-Lösung wiedergegeben.

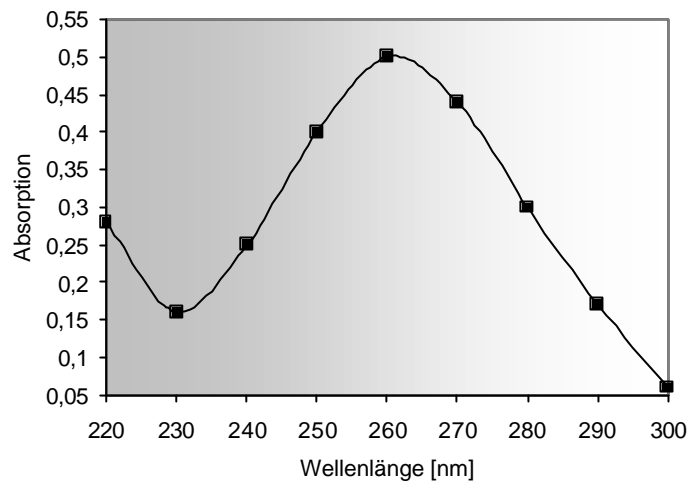


Abb. 4.2: Absorptionsspektrum der isolierten RNA von 220-300 nm

Die Qualität der isolierten RNA wurde weiterhin durch denaturierende Agarosegelelektrophorese überprüft (3.2.12.3). Da rRNA den Hauptteil der zellulären RNA stellt und die einzige RNA-Spezies ist, die man im Agarosegel mit Ethidiumbromid nachweisen kann, werden die Banden der 18S-rRNA und 28S-rRNA als Kriterium für die Integrität der RNA angesehen. Die beiden Banden sind bei nicht degradiert RNA deutlich zu erkennen, zudem sollte die Intensität der 28S-rRNA stärker als die der 18S-rRNA sein. Die gelelektrophoretische Analyse in Abbildung 4.3 zeigt die Integrität der isolierten RNA. Die definierten Banden der 18S-rRNA und 28S-rRNA waren deutlich zu sehen. Da zudem die Intensität der 28S-rRNA stärker war als die der 18S-rRNA, war die isolierte gesamtzelluläre RNA intakt und konnte zur Transkriptionsstartpunktbestimmung eingesetzt werden.

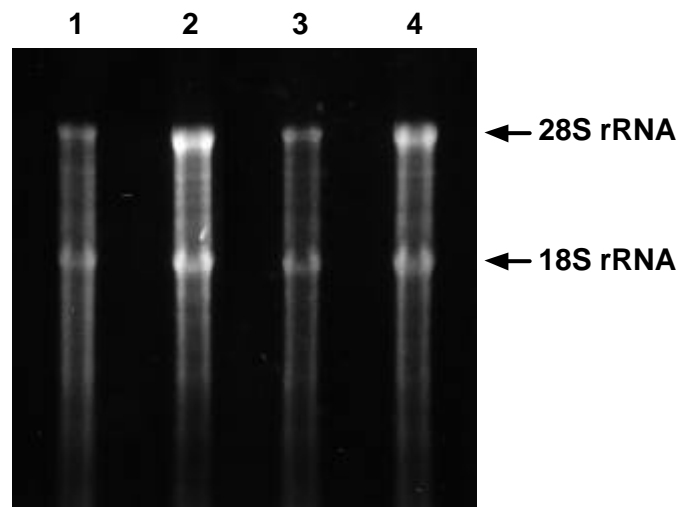


Abb. 4.3: Gelelektrophoretische Analyse der isolierten gesamtzellulären RNA aus Schweinegehirn

Die Intaktheit der isolierten gesamtzellulären RNA (Spur 1-4) ist an den definierten Banden der rRNAs und an der stärkeren Intensität der 28S-rRNA zur 18S-rRNA zu erkennen.

4.2.3 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch *Primer Extension*

Die Gesamtlänge der mRNA *sp* 83.5 wurde in Northern-Blot Analysen auf 2,5 kb geschätzt (Schepelmann, 1996). Die Länge der bekannten cDNA-Sequenz, die durch 5'-RACE-PCR ermittelt wurde, betrug zu diesem Zeitpunkt 2.332 bp (Schepelmann, 1996). Somit war zu erwarten, dass die *Primer Extension* Analyse über die Startpunktbestimmung hinaus die fehlende Sequenzinformation im 5'-Bereich der mRNA *sp* 83.5 liefern kann.

Zur Transkriptionsstartbestimmung wurden aus dem bekannten individuellen 5'-Ende der cDNA-Sequenz fünf Oligonukleotidprimer mit der Bezeichnung PE01 bis PE05 eingesetzt (3.1.14.2). Die ausgewählten Oligonukleotid-Primer und ihre Positionen innerhalb der cDNA-Sequenz sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

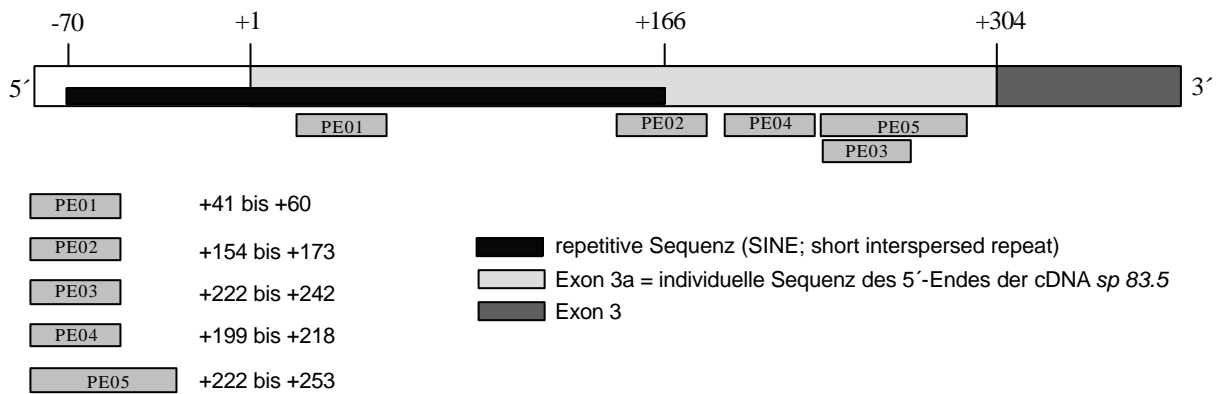


Abb. 4.4: Die Lage der in den *Primer Extension* Analysen verwendeten Oligonukleotidprimern innerhalb des 5'-Endes der bekannten cDNA-Sequenz der mRNA sp 83.5.

Zur radioaktiven Markierung der Oligonukleotide am 5'-Ende wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl 10 pmol des jeweiligen Oligonukleotids und 80 µCi [γ - 32 P]-ATP mit dem Enzym T4-Polynukleotidkinase umgesetzt (3.2.7.1). Nichtumgesetzte Nukleotide wurden durch Sephadex G-25 Gelpermeationschromatographie abgetrennt (3.2.5.5).

Jeweils 1×10^7 cpm des markierten Oligonukleotids wurden mit 150 µg gesamtzellulärer RNA über Nacht bei 37 °C hybridisiert (3.2.15). Anschließend wurde das DNA/RNA-Hybrid mit Ethanol gefällt und in Reverse Transkriptase Puffer gelöst. Zur cDNA-Synthese wurde jeweils 50 U SuperScript Reverse Transkriptase eingesetzt, 90 min bei 42 °C inkubiert, und anschließend die RNA durch RNase A hydrolysiert. Nach einer Phenolextraktion und Ethanolfällung wurde die radioaktiv markierte cDNA in einem Gemisch aus TE-Puffer und Formamid-Puffer gelöst und durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (3.2.12.2, verwendet wurde ein 5 %iges Polyacrylamidgel). Als Größenreferenz dienten Sequenzierungsreaktionen des Subklons pTB12 und pTB14 (Bangsow, 1996) mit den in die *Primer Extension* Reaktion eingesetzten Oligonukleotiden.

Die Primer Extension Analyse führte mit allen verwendeten Oligonukleotidprimern zu einer cDNA-Produktbildung. Die Lage der erhaltenen cDNA-Produkte ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

Das cDNA-Produkt unter Verwendung des Oligonukleotidprimers PE03 hatte eine Länge von 283 Nukleotiden (Abb. 4.5), der durch dieses Produkt definierte Startpunkt ist identisch mit dem aus der Reaktion mit PE05, das eine cDNA von 294 Nukleotiden bildete (Abb. 4.5).

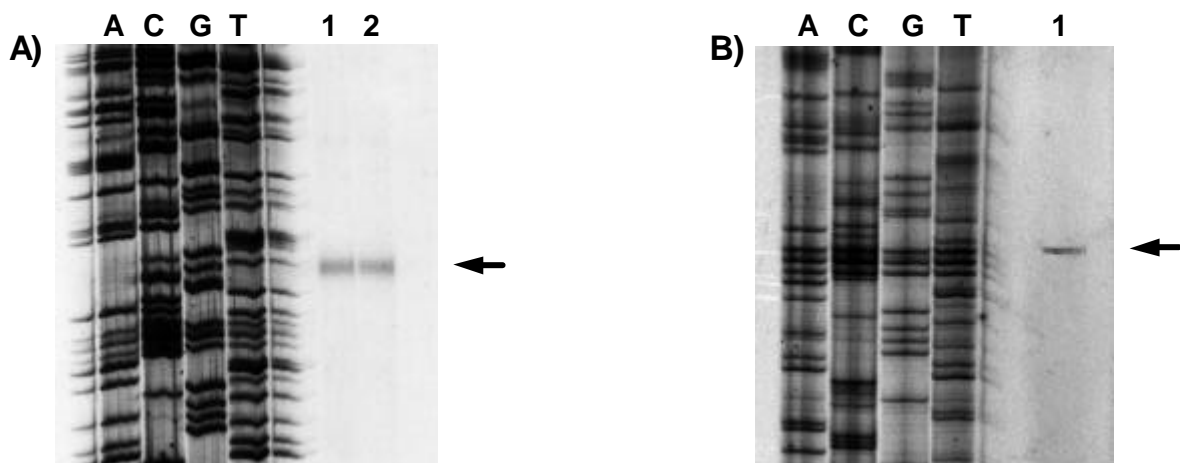


Abb. 4.5: Gelelektrophoretische Analyse der Produkte der Primer Extension Ansätze mit den Oligonukleotidprimern PE03 und PE05

A) Spur 1 und 2: 283 nt langes cDNA-Produkt unter Verwendung von PE03 als Oligonukleotidprimer; A, C, G, T = Sequenzierreaktion pTB12/PE03 B) Spur 1: mit PE05 erhaltenes 294 nt langes cDNA-Produkt; A, C, G, T = Sequenzierreaktion pTB12/PE05.

Die Reaktion mit dem Oligonukleotidprimer PE01, der aus der repetitiven SINE-Sequenz abgeleitet wurde, lieferte wie zu erwarten zahlreiche Produkte, wobei die stärksten cDNA-Produkte eine Länge von 101/102, 95 und 91/90 Nukleotiden aufwiesen (Abb. 4.6). Der Oligonukleotidprimer PE02, der teilweise komplementäre Sequenzen zur SINE-Sequenz trägt, führte ebenfalls zu zahlreichen cDNA-Produkten mit einer Länge von 214, 260, 265, 300, 328 und 351 Nukleotiden. Die Lage der ersten vier Produkte sind in der Abbildung 4.6 angegeben, die übrigen lagen weiter in 5'-Richtung entfernt. Die ermittelten Transkriptionsstartpunkte anhand des 101/102 nt langen cDNA-Produktes mit PE01 und des 214 nt langen cDNA-Produktes mit PE02 sind identisch mit den durch PE03 und PE05 erhaltenen Transkriptionsstartpunkten. Mit dem Oligonukleotidprimer PE04 entstand ein Produkt von 181/182 Nukleotiden.

Das mit dem Oligonukleotid PE04 ermittelte verkürzte Reaktionsprodukt lässt sich durch vorzeitigen Abbruch der Reverse Transkriptase Reaktion aufgrund von Sekundärstrukturen in der RNA-Matrize erklären. Der Oligonukleotidprimer PE01 und 13 Nukleotide des PE02 Primers wurden aus der SINE-Sequenz (4.4) abgeleitet, die häufig in mRNA-Sequenzen aus Schwein vorkommen (Frengen et al., 1991). Für diese *Primer Extension* Reaktionen wurden deshalb zahlreiche cDNA-Produkte erhalten. Die deutlichsten cDNA-Produkte mit diesen Primern lagen jedoch an derjenigen Position, die auch mit den Primern PE03 und PE05 erhalten wurden. Die Primer Extension Reaktionen mit den Primern PE03 und PE05 führten jeweils zu einem starken cDNA-Produkt (Abb. 4.5), die sich lediglich um ein Nukleotid unterscheiden.

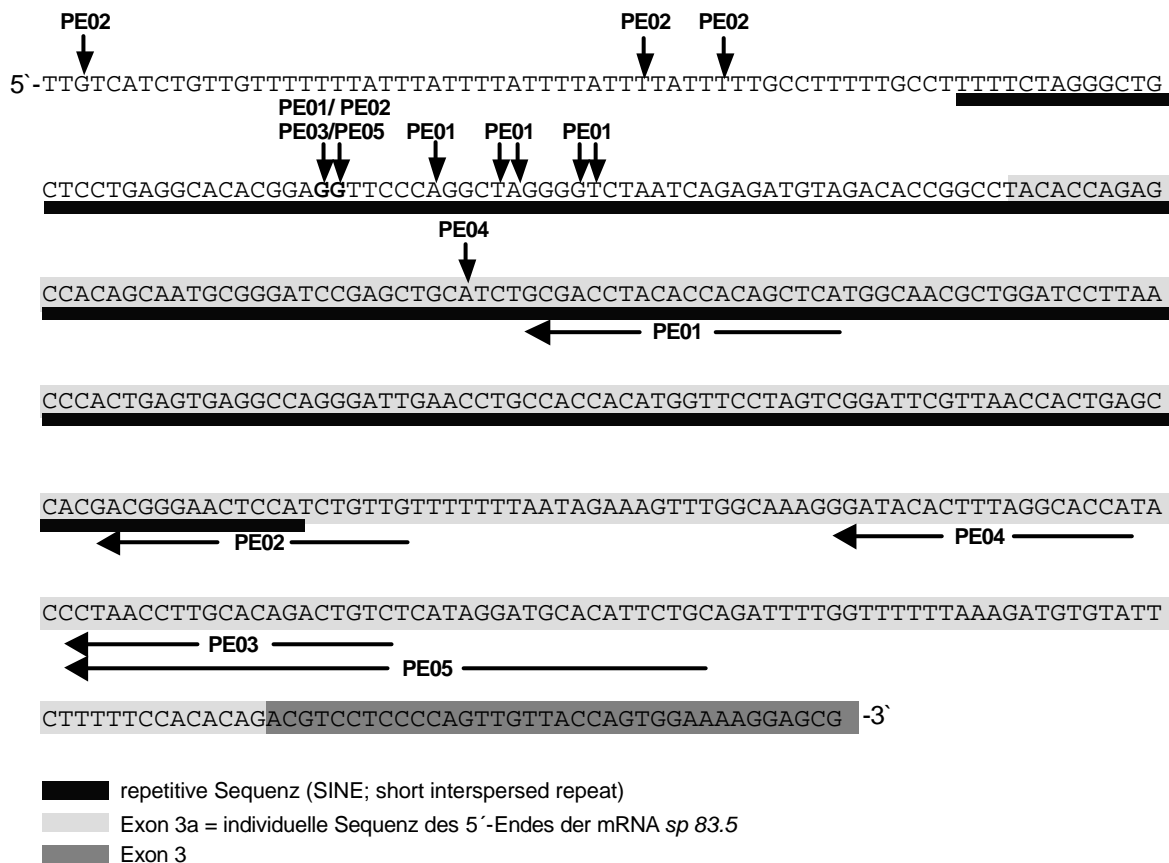


Abb. 4.6: Lage der mit den Oligonukleotiden PE01, PE02, PE03, PE04 und PE05 erhaltenen cDNA-Produkte

Die *Primer Extension* Analyse führte somit zu einem definierten Startpunkt der Transkription, der 42 Nukleotide vom bekannten 5'-Ende der cDNA-Sequenz *sp* 83.5 entfernt liegt.

Aus der Transkriptionsstartpunktbestimmung resultiert eine Gesamtlänge der mRNA *sp* 83.5 von 2.374 nt. Innerhalb der genomischen Sequenz liegt der Startpunkt der Transkription an Position 13.779 des Gens 83.5 (siehe Anhang 7.1 und 7.2).

4.3 Analyse der Promotorregion *sp* 83.5 auf potenzielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren

Der ermittelte Transkriptionsstartpunkt (4.2.3) legt das 5'-Ende der mRNA *sp* 83.5 und den Übergang von der Promotorregion zu dem Strukturgen in der Sequenz des Gens 83.5 fest. Eine 611 bp umfassende Region des Promotors *sp* 83.5 stromaufwärts des ermittelten Transkriptionsstartpunktes wurde mit dem Programm MatInspector professional (Quandt et al., 1995) auf Bindestellen für bekannte Transkriptionsfaktoren untersucht. Dieses Computerprogramm enthält eine Sammlung von 400 bekannten Transkriptionsfaktor-Bindestellen verschiedener Spezies (z.B. Pilze, Insekten und Vertebraten). Die Zuordnung der Transkriptionsfaktoren innerhalb dieses Promotorbereiches ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Interessanterweise konnte am Startpunkt der Transkription ein Initiatorelement, der Muscle-INO, zugeordnet werden. Mögliche TATA-Boxen befinden sich in der AT-reichen Region 48 bp stromaufwärts des Startpunktes, jedoch sind diese üblicherweise 25–30 bp vom Startpunkt entfernt. Auffallend hierbei ist die große Zahl zell- und gewebespezifischer Transkriptionsfaktoren. Für den induzierbaren Transkriptionsfaktor AP1 wurden fünf Bindestellen, für die gewebespezifischen Faktoren AP2 vier und für AP4 neun Bindestellen identifiziert. Auch die Ikaros Faktoren (IK2, IK3), die im Gehirn im Corpus striatum exprimiert werden, sind neunmal vertreten. Weiterhin sind viele neuronalspezifische Transkriptionsfaktoren wie Oct-6, Oct-2, MEF2, N-Oct-3, Olf1, NRSF, HEN1, MYT1, Pit1, NF- κ B mehrmals vertreten, wie auch die gehirnspezifischen Transkriptionsfaktoren NF1, Hlf, und Ets1. Weiterhin wurden Bindestellen für Repressoren gefunden: eine Bindestelle für den Repressor CDP an Position –78 und den Repressor E4BP4 an Position –112 sowie zwei Bindestellen für den neuronalen Repressor NRSF. In der Promotorsequenz ebenfalls stark vertreten sind Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die über Steroidhormone induziert werden (in der Abbildung 4.7 nicht aufgeführt). So befinden sich in diesem Promotorabschnitt jeweils vier Bindestellen für die durch Retinsäure induzierbaren Transkriptionsfaktoren ROR α -1 und RAR, zwei Bindestellen für den durch Glucocorticoide induzierbaren Transkriptionsfaktor GR und eine Bindestelle für den Progesteron induzierbaren Transkriptionsfaktor PR. Darüber hinaus enthält die Promotorregion acht Bindestellen für den durch Serum induzierbaren Transkriptionsfaktor SRF.

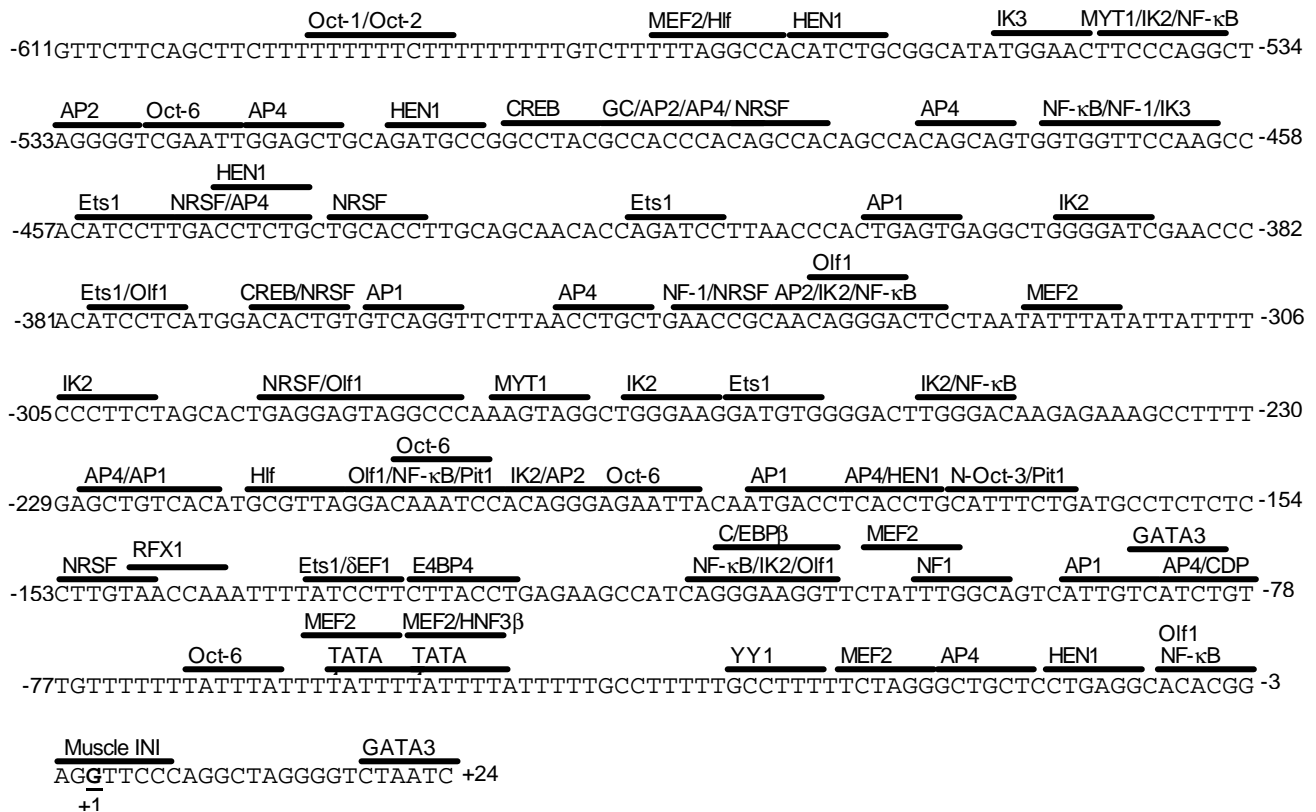


Abb. 4.7: Die Lage potenzieller Bindestellen für Transkriptionsfaktoren innerhalb des Promotors *sp* 83.5

Die Position des Transkriptionsstartpunktes ist unterstrichen und mit +1 gekennzeichnet. Dargestellt sind jeweils die Kernsequenzen der Proteinbindestellen und die Bezeichnung des Transkriptionsfaktors.

Die enorm hohe Zahl von Bindestellen für gehirnspezifische und neuronale Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion korreliert mit der spezifischen Expression der mRNA *sp 83.5* in diesem Gewebetyp.

4.4 Sequenzvergleiche der mRNA *sp*, *tmp* 83.5 und des Gens 83.5

4.4.1 Sequenzvergleich der mRNA *sp* 83.5

Durch die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des Promotors *sp* 83.5 konnte die vollständige mRNA-Sequenz des Transkriptes *sp* 83.5 bestimmt werden (4.2). Die mRNA-Sequenz wurde um 42 bp erweitert, wodurch eine Gesamtlänge von 2.374 bp resultierte. Die 5'-nichttranslatierte Region, d.h. die Sequenz zwischen Transkriptionsstartpunkt und Translationsstartcodon, beträgt 596 bp und die 3'-UTR 1.641 bp. Der codierende Bereich der mRNA *sp* 83.5 erstreckt sich über 140 nt und führt zu einem 46 Aminosäuren langen Protein SP 83.5, das mit dem C-Terminus des Transmembranproteins identisch ist, aber nur die cytoplasmatische Domäne des Proteins enthält.

Die vollständige mRNA Sequenz *sp* 83.5 wurde auf Sequenzhomologien mit dem Programm BLASTN der nicht-redundanten Nukleinsäuredatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI; Altschul et al., 1997) untersucht.

In der Tabelle 4.2 sind die vier höchsten Homologien des Transkripts *sp* 83.5 zu Sequenzen der NCBI-Datenbank aufgeführt.

Tab. 4.2: Sequenzhomologien zu der mRNA *sp* 83.5

Nr.	Sequenz	Spezies	GenBank Bezeichnung	Homologie [%]
1	cDNA-Klon RP44-30C22	<i>Sus scrofa</i>	AC092497	100
2	MHC Klasse I SLA Gen	<i>Sus scrofa</i>	AJ251914	100
3	c-Myc Proto-Onkogen	<i>Sus scrofa</i>	AJ000928	100
4	Transmembranprotein HTMP10, mRNA	<i>Homo sapiens</i>	AF367761	82

Die 100 %ige Homologie bestehen bei allen cDNA-Sequenzen nur zu sehr kurzen Sequenzbereichen von 30 bis 35 Basen. Eine genauere Betrachtung der Sequenzen zeigte, dass es sich hierbei um Homologien zu SINE-Sequenzen (4.1) im 5'-UTR des Transkripts *sp* 83.5 (Position +113 bis +207 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt +1) handelte. Eine Sequenzidentität in der codierenden Region der mRNA *sp* 83.5 besteht nur zu dem humanen Transkript HTMP10 (Nobile et al., 2002), das in Abschnitt 4.4.3 näher beschrieben ist. Die Identität auf Nukleinsäureebene beträgt in diesem Bereich 82 % und in der Aminosäuresequenz beider Proteine 80 %.

4.4.2 Sequenzvergleich des Gens 83.5

Die komplette Sequenz des Gens 83.5 mit 21.746 bp wurde mit dem Programm BLAST der nicht-redundanten Nukleinsäuredatenbank der NCBI (Altschul et al., 1997) auf Sequenzhomologien zu anderen Genen untersucht. Anhand eines Sequenzvergleichs lassen sich Zuordnungen zu bekannten Genfamilien treffen oder homologe Gene anderer Spezies zuweisen. Es wurden eine Vielzahl von Homologien hauptsächlich zu Sequenzen des Schweins gefunden. Die sechs höchsten Homologien sind in der Tabelle 4.3 aufgelistet.

Tab. 4.3: Sequenzhomologien zu dem Gen 83.5

Nr.	Sequenz	Spezies	Genbank Bezeichnung	Homologie [%]
1	MHC Klasse I SLA Gen	<i>Sus scrofa</i>	AJ251829	94
2	Klon RP44-39	<i>Sus scrofa</i>	AC091507	90
3	Klon RP44-51907	<i>Sus scrofa</i>	AC096884	78
4	Triadin Gen	<i>Sus scrofa</i>	AJ007302	78
5	Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 3	<i>Sus scrofa</i>	AJ404883	78
6	Chromosom 10 Sequenz-Segment	<i>Homo sapiens</i>	NT_029394	/

Die Sequenzhomologien Nr. 1 bis 5 bestehen alle zu den repetitiven SINE-Sequenzen (siehe 4.1), die im Genom des Schweins häufig vorkommen, und liegen alle außerhalb der Exons des Gens 83.5.

Diese Homologien erlauben aus zwei Gründen keine Zuordnung zu einer Genfamilie: einerseits bestehen die Homologien wie bereits erwähnt ausschließlich zu SINE-Sequenzen in Intron Bereichen, d.h. es sind keine für codierende Sequenzen verantwortliche Homologien, andererseits bestehen jeweils nur Homologien zu sehr kurzen Bereichen von 30 bis 100 Basen.

Die genomische Sequenz 83.5 wurde weiterhin mit dem Programm Genomic BLAST der NCBI (Altschul et al., 1997) gegen genomische Sequenzen des Menschen, der Maus und Ratte verglichen. Hierbei wurden nur relevante Homologien des Gens 83.5 zu einer genomischen Teilsequenz des humanen Chromosoms 10 in der Region q24 erhalten. Diese Region entspricht der genomischen Sequenz der mRNA HTMP10 (siehe Abschnitt 4.4.3), welche für das humane Gegenstück des Transmembranprotein TMP 83.5 codiert. Die genomische Sequenz HTMP10 wurde durch Sequenzvergleich der cDNA HTMP10 mit humanen BAC-Klonen (RP11-35J23) erzielt (Nobile et al., 2002). Die cDNA-Sequenz erstreckt sich über eine Länge von 16 kb über die genomische Sequenz des Chromosoms 10 Region q24. Die Sequenzidentitäten des Gens 83.5 bestehen zu codierenden (siehe Abschnitt 4.4.3), Intron- und dem potenziellen Promotorbereich des Gens HTMP10.

4.4.3 Sequenzvergleich der mRNA *tmp* 83.5

Die Sequenz der mRNA *tmp* 83.5 mit 2.674 nt wurde auf Sequenzhomologien mit dem Programm BLASTN der nichtredundanten Nukleinsäuredatenbank des NCBI (Altschul et al., 1997) untersucht.

Die Untersuchung eines Transkriptes ist sehr viel empfindlicher, da hier keine Beeinflussung durch nicht-codierende Sequenzen, die ca. 90 % des Gens 83.5 ausmachen,

stattfindet. Die signifikanten Homologien der mRNA *tmp* 83.5 zu Sequenzen des NCBI sind in der Tabelle 4.4 aufgeführt.

Tab. 4.4: Sequenzhomologien zu der mRNA *tmp* 83.5

Nr.	Sequenz	Spezies	Genbank Bezeichnung	Homologie [%]
1	Transmembranprotein HTMP10, mRNA	<i>Homo sapiens</i>	AF367761	82
2	NIH_MGC_96, cDNA-Klon	<i>Homo sapiens</i>	BI599828	80
3	NIH_MGC_95	<i>Homo sapiens</i>	BI548105	80
4	CM2_NN1145-230900-384-g09	<i>Homo sapiens</i>	BF365005	79
5	cDNA-Klon MNCb-0248	<i>Mus musculus</i>	AU035253	82
6	UI-M-BH3-asx-d-09-0-U1.r1, cDNA-Klon	<i>Mus musculus</i>	BE651315	81
7	UI-M-BH1-ald-g-04-0-U1.r1, cDNA-Klon	<i>Mus musculus</i>	BE646657	80

Die höchste Homologie besteht zu einer humanen mRNA, die für ein Transmembranprotein mit der Bezeichnung HTMP10 codiert (Nobile et al., 2002). Die vollständige mRNA Sequenz von 3.554 Basen wurde aus mehreren überlappenden cDNA-Klonen abgeleitet. Die cDNA-Klone wurden aus cDNA-Banken isoliert, die aus Transkripten des humanen Gehirns erstellt worden waren. Die mRNA-Sequenzen *tmp* 83.5 und HTMP10 weisen über einen weiten Bereich eine Sequenzidentität von 77 bis 82 % auf. Die höchste Sequenzidentität besteht zu dem codierenden Bereich beider mRNAs, der über 678 nt (*tmp* 83.5: 496-1.174 und HTMP10: 317-994) eine 82 %ige Homologie besitzt. In diesem Bereich fehlen der humanen mRNA drei Nukleotide (entsprechend ein Codon), woraus das um eine Aminosäure verkürzte humane Protein HTMP10 (AAK62349) mit 141 Aminosäuren resultiert. Zu der nichttranslatierten 5'-Region besteht eine Identität von 77 % (*tmp* 83.5: 192-496; HTMP10: 16-317). Der sich an die codierende Region anschließende nichttranslatierte 3'-Bereich von der Position *tmp* 83.5 1.271 bis 1.426 (HTMP10: 1.087-1.245) und 1.973 bis 2.314 (HTMP10: 2.853-3.206) weist eine 77 %ige bzw. 72 %ige Sequenzidentität auf, wobei dieser Bereich in der HTMP mRNA weiter in 3'-Richtung liegt als ein linearer Abgleich ergeben würde. Auch das 200 nt lange 3'-Ende beider Transkripte (*tmp* 83.5: 2.456-2.655; HTMP10: 3.363-3.555) hat eine Sequenzidentität von 77 %.

Die hohe Sequenzidentität beider mRNAs zeigt sich besonders deutlich auf der Ebene der Aminosäuresequenzen. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen (Abb. 4.8) zwischen dem porcinen Protein TMP 83.5 und dem humanen Protein htmp10 zeigt eine Identität von 80,3 %.

```

tmp83.5: MSFSLNFTLPANTTSSPVVTSKGADCGPSLGLAAGIPSLVATALLVALL
HTMP10: MSFSLNFTLPANTTSSPVTG-GKETDCGPSLGLAAGIPLLVATALLVALL
mtmp:    MSFSLNFTLPSNTTSSPVTSKATDCGPSIGLAAGIPSLLATALLVLL

tmp83.5: LILIHRRRRSS-ESTEEIERPCEISEIYDNPRVAENPRRSPTHEKNIMGA
HTMP10:  FTLIHRRRSSI-EAMEESDRPCEISEIDDNPKISEENPRRSPTHEKNTMGA
mtmp:    FTLIQRRRTIDDEPVEETEIPCEISELYDNPKISEENPRRSPTHEMNPRGS

tmp83.5: EEAHIYVKTVSGSQEPMRDTYRPAVEMERRRGLWWLIPRLSLE (142 AS)
HTMP10: QEAHIYVKTVAGSEEPVHDRYRPTIEMERRRGLWWLVPRLSLE (141 AS)
mtmp:    QEGHIYVKTVSGSQEPLPDTYRPEELEMERRRGLWWLVPSLSLE (143 AS)

```

Abb. 4.8: Vergleich der Aminosäuresequenzen TMP 83.5 mit dem humanen (htmp10) und murinen (mtmp) Transmembranprotein.

Die 142 lange Aminosäuresequenz des TMP 83.5 ist in der oberen Zeile dargestellt, die des 141 Aminosäuren langen humanen Proteins htmp10 in der mittleren und das 143 Aminosäuren lange murine Protein mtmp in der unteren. Fett dargestellt sind die Aminosäurereste, die in allen drei Spezies konserviert sind. Balken (-) symbolisieren fehlende Aminosäurereste.

Die genomische Sequenz HTMP10 liegt auf dem Chromosom 10 in der Region q24 (10q24, Nobile et al., 2002). In diesem Chromosomenabschnitt befinden sich mehrere Gene, die in Zusammenhang stehen mit schweren, vererbaren neurologischen Krankheiten wie der spastischen Paraparese (Seri et al., 1999), dem Ochoa Syndrom sowie der vererbaren Form der partiellen Epilepsie (Nobile und Pitzalis, 1999).

Drei weitere relevante Homologien der mRNA *tmp 83.5* zu humanen Transkripten wurden bei den Klonen Nr. 2 bis 4 (Tab. 4.4) gefunden, die aus Teilsequenzen der codierenden Region der mRNA HTMP10 bestehen. Diese sogenannten Expressed Sequence Tags (EST) wurden aus cDNA-Banken erhalten, aus denen auch die cDNA-Klone des HTMP10 isoliert wurden. Der EST Nr. 2 wurde aus einer cDNA-Bank des Hypothalamus, Nr. 3 aus einer cDNA-Bank des Hippocampus und Nr. 4 aus einer cDNA-Bank des Nervensystems isoliert. Alle drei cDNA-Klone umfassen die codierende Region der mRNA *tmp 83.5* mit der in Tabelle 4.4 angegebenen Sequenzidentität.

Weitere signifikante Homologien zur codierenden Region der mRNA *tmp 83.5* bestehen zu ESTs der Maus (Tabelle 4.4, Nr. 5 bis 6). Der 306 nt lange EST MNCb-0248 wurde aus einer cDNA-Bank isoliert, die aus murinem Gehirn hergestellt wurde. Der Sequenzvergleich führt zu einer Sequenzidentität von 79-82 % im Bereich 579 bis 762 der mRNA *tmp 83.5*, der für die extrazelluläre Domäne und den Membrananker codiert. In einem 51 Aminosäuren umfassenden Bereich der cytoplasmatischen Domäne (*tmp 83.5*: 798 bis 953) ergab sich eine 80 %ige Identität. Die beiden murinen cDNA-Klone Nr. 5 und 6 (Tab. 4.4) zeigten ebenfalls Sequenzidentitäten zum codierenden Bereich der mRNA

tmp 83.5, der für die extrazelluläre, Transmembran- und cytoplasmatische Domäne codiert. Diese cDNA-Klone wurden ebenfalls aus cDNA-Banken des Gehirns der Maus erhalten.

Aus dem Sequenzvergleich vorhandener EST-Sequenzen der Maus und der HTMP10 Sequenz konnte eine cDNA-Sequenz (GenBank TPA-Bezeichnung BK000002) mit 2.602 bp abgeleitet werden, deren ORF 429 nt umfasst (Nobile, 2002). Die abgeleitete Aminosäuresequenz (mtmp) der Maus cDNA ist im Vergleich zu dem TMP 83.5 und htmp10 in Abbildung 4.8 aufgeführt. Die 79 %ige Sequenzidentität zwischen mtmp und TMP 83.5 ist ähnlich hoch wie für das Protein htmp10.

Aufgrund der hohen Sequenzidentitäten mit den humanen und murinen Transkripten, vor allem zu den codierenden Bereichen der mRNA, kann davon ausgegangen werden, dass die mRNA *tmp* 83.5 bzw. das Protein auch bei Mensch und Maus vorkommt.

4.5 Identifizierung funktioneller Elemente des Promotors *tmp* 83.5

4.5.1 Konstruktion von Promotortestplasmiden

Für die Analyse regulatorischer cis-Sequenzelemente im Promotor *tmp* des Gens 83.5 wurden transiente Transfektionen mit Promotortestplasmiden durchgeführt, die zunehmende 5'-Verkürzungen des Wildtyp-Promotors enthielten.

Insgesamt sollten 11 zunehmend 5'-verkürzte Promotorbereiche des Wildtyp-Promotors in das Reporterplasmid pGL3-Basic inseriert werden, die ungefähr 2.000, 1.700, 1.350, 1.000, 800, 600, 500, 250, 150, 100 und 80 Basenpaare stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt enden sollten.

Der Luciferase-Reportervektor pGL3-Basic (3.1.12.2) enthält neben dem Ampicillinresistenzgen das Luciferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*. Diesem Reportervektor fehlen eukaryontische Promotor- und Enhancersequenzen, so dass er sich zur Insertion von zu untersuchenden Promotoren eignet. Wenn die eingefügte Sequenz einen funktionsfähigen Promotor enthält, wird das Luciferasegen in den transfizierten Zellen exprimiert. Die Fragmente aus dem Promotor *tmp* 83.5 wurden in den Polylinker des Plasmids inseriert und die erhaltenen Promotortestplasmide anschließend in zwei neuronale und eine nichtneuronale Zelllinien (3.1.13) transfiziert. Die Expression des Luciferasegens korreliert dadurch mit der Transkriptionsaktivität der vorgeschalteten Promotorkonstrukte. Besitzt das Promotor-Fragment eine regulatorische Funktion, so wird die Aktivität des Promotors und damit die Expressionsrate der Luciferase unter dem Einfluss zellulärer Transkriptionsfaktoren erhöht oder erniedrigt. Experimentell kann die Expressionshöhe durch die Messung der Lichtemission bestimmt werden, die bei der Umsetzung von Luciferin durch das Enzym Luciferase auftritt (3.2.20.4). Vergleicht man

die Transkriptionsaktivität mit dem Ausmaß der 5'-Deletion, so lassen sich transkriptionsaktivierende bzw. -reprimierende Sequenzelemente eingrenzen und funktionell bestimmen.

Alle Promotorfragmente müssen ein definiertes 3'-Ende besitzen, um einen direkten Vergleich der Expression der verschiedenen Promotortestplasmide zu ermöglichen. Unterschiede in der Expressionshöhe sind so nur abhängig von der Veränderung im Promotor und nicht vom Integrationsort oder einem unterschiedlichen Gendosiseffekt. Der Wildtyp-Promotor umfasst 4.607 bp und erstreckt sich vom Transkriptionsstartpunkt bis zum 5'-Ende des Gens 83.5.

Der 5'-nichttranslatierte Bereich (5'-UTR) mit einer Länge von 587 bp erstreckt sich vom Transkriptionsstartpunkt bis zum Startcodon der Translation der mRNA *tmp* 83.5. Innerhalb dieses Sequenzabschnittes können sich ebenfalls regulatorische Elemente der Transkription befinden. Zur Untersuchung der regulatorischen Elemente innerhalb dieses Bereiches auf die Transkriptionsaktivität wurden zwei weitere Promotorkonstrukte hergestellt, die in Transfektionen eingesetzt wurden. Zum einen der Wildtyp-Promotor pProm 4.350 erweitert mit der 5'-UTR und zum anderen der basale Promotorbereich 80 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes ebenfalls erweitert mit der 5'-UTR. Der Vergleich dieser Konstrukte mit denjenigen ohne 5'-UTR sollte wichtige Kontrollelemente in der stromabwärts gelegenen 5'-UTR zeigen.

Geeignete singuläre Restriktionsschnittstellen zur direkten Klonierung des Wildtyp-Promotors und der übrigen Konstrukte in den Luciferase-Vektor waren nicht vorhanden. Deshalb wurde zunächst der Promotorbereich von 1.700 bp über die Polymerase-Kettenreaktion (3.2.9) amplifiziert. Dieser Bereich wurde für die PCR gewählt, da bei dieser Sequenzlänge die Wahrscheinlichkeit gering ist Punktmutationen einzuführen und er sich gut über die PCR amplifizieren lässt. Weiterhin enthielt dieses Promotorfragment nach der Klonierung in den pGL3-Vektor singuläre Restriktionsschnittstellen zur Erzeugung des Wildtyp-Promotors und des nächsten verkürzten Promotorbereichs von 2.000 bp. Darüber hinaus konnten die übrigen 5'-verkürzten Promotortestplasmide durch die Methode der *Nested Deletion* (3.2.10) aus diesem generiert werden.

Alle Promotorkonstrukte besitzen ein definiertes 3'-Ende an Position +24 und erhielten die Bezeichnung pProm. Die Zahl hinter dem Kürzel pProm gibt die Länge des Promotor-Fragmentes an. In der Abbildung 4.19 sind die generierten Promotorkonstrukte zusammengefasst dargestellt.

4.5.1.1 Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 1.700

Der 1.700 bp umfassende Promotorbereich wurde über die Polymerase-Kettenreaktion (3.2.9) erzeugt. Die zur Klonierung in die Polylinkerregion des Vektors pGL3-Basic notwendigen Restriktionsschnittstellen wurden hierbei durch Verwendung von PCR-Primern mit zusätzlichen Erkennungssequenzen für die entsprechenden Restriktionsenzyme Nhe I und Xho I am 5'-Ende eingeführt. Die verwendeten Oligonukleotidprimer für die PCR-Amplifikation des Promotorbereichs 1.700 sind in der Abbildung 4.9 dargestellt.

Primer I: 5' -CGATTGCTAGCGGCTGTGGGGAAGTTGCTGA-3'
Nhe I komplementäre Sequenz zum 5'-Bereich, Position -1.682 bis -1.662

Primer II: 5' - GCTATCTCGAGGAGAGTGCACGCCCTTGAAT - 3'
Xho I komplementäre Sequenz zum 3'-Bereich, Position +4 bis +23

Subklon pTB22 (-4.607 bis +2.904):

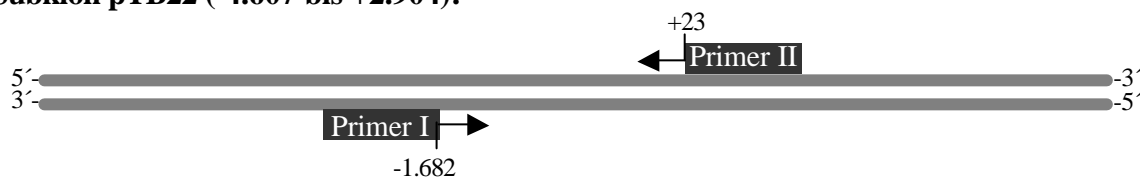


Abb. 4.9: Schematische Darstellung der Oligonukleotidprimer und deren Position innerhalb der mittels PCR zu amplifizierenden Promotorregion 1.700 des Subklons pTB22

Die Oligonukleotidprimer I und II sind gegenläufig orientiert, zusätzlich zur komplementären Sequenz des jeweiligen DNA-Stranges tragen sie am 5'-Ende Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen Nhe I und Xho I, die eine direkte Klonierung des Promotorfragmentes in den pGL3-Basic Vektor ermöglichten.

Als Matrizen-DNA für die PCR-Amplifikation des Promotorbereichs diente ein Subklon des Gens 83.5 mit der Bezeichnung pTB22 (Bangsow, 1996). Dieser erstreckt sich von Position -4.607 bis +2.904 auf dem Gen 83.5.

Für die PCR-Amplifikation des Promotorbereichs 1.700 wurde folgender Ansatz pipettiert:

Volumen [μl]	Substanzen
10	10 x PCR Puffer
2	10 mM dNTP-Mix
3	50 mM MgCl_2
1	10 ng/ μl pTB22
2,5	10 pmol/ μl Primer I
2,5	10 pmol/ μl Primer II
78,5	H_2O
0,5	5 U/ μl <i>Taq</i> -Polymerase

Folgendes PCR-Programm unter Verwendung verschiedener Hybridisierungstemperaturen wurde durchgeführt:

1 Zyklus	Denaturierung:	5 min bei 95 °C
35 Zyklen	Denaturierung:	45 s bei 95 °C
	Hybridisierung:	1 min bei 58, 60, 62, 64 und 66 °C
	Primer-Verlängerung:	2 min bei 72 °C
1 Zyklus	Primer-Verlängerung:	10 min bei 72 °C

Die eingesetzte *Taq*-Polymerase besitzt keine 3'→5'-Exonukleaseaktivität, d.h. keine Korrekturlesefunktion, die falsch eingebaute Nukleotide hydrolytisch entfernt. Daher wurde parallel zu diesen Ansätzen die Pwo-DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion eingesetzt (3.2.9). Die Puffer und Lösungen wurden vom Hersteller verwendet und nach dessen Angaben pipettiert. Die Größe und Qualität der PCR-Produkte wurden in einem 1 %igen Agarosegel analysiert (3.2.12.1). Hierzu wurden jeweils 15 μl des PCR-Ansatzes mit 3 μl Auftragspuffer versetzt und gelelektrophoretisch getrennt (Abb. 4.10).

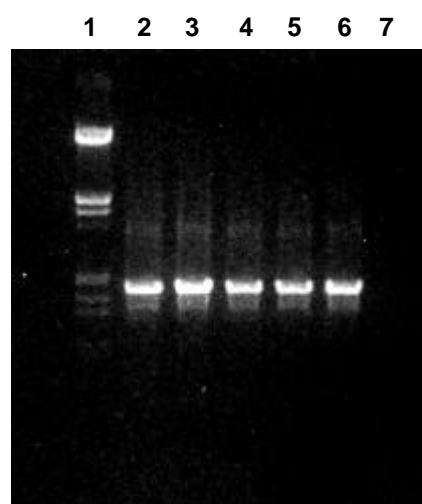


Abb. 4.10: Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte

Spur 1: DNA-Größenstandard Molecular Weight Marker III; Spur 2-6: PCR-Ansätze bei den Hybridisierungstemperaturen 58, 60, 62, 64 und 66 °C; Spur 7: Negativkontrolle PCR-Ansatz ohne DNA.

Die PCR-Ansätze wurden über das PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt und in den pGEM-T Vektor (3.1.12) inseriert. Das Plasmid pGEM-T wurde vom Hersteller mit der Restriktionsendonuklease EcoR V linearisiert und mit einem 3'-terminalen Thymidin an beiden Enden versehen. Diese verhindern die Religation des Vektors und ermöglichen die Insertion von PCR-Fragmenten, die über die *Taq*-Polymerase synthetisiert wurden, ohne vorherige Restriktion zur Bildung von kompatiblen überstehenden Enden. Zur Ligation der PCR-Fragmente mit dem Vektor wurden 0,09 pmol PCR-Fragment mit 0,03 pmol pGEM-T Vektor nach der unter 3.2.8.3 beschriebenen Methode in Gegenwart von T4 DNA Ligase inkubiert. 10 µl der Ligationsansätze wurden in *E. coli* DH5α transformiert (3.2.3.1) und die Transformanten nach der Isolierung der Plasmid-DNA (3.2.4.1) durch Restriktionsanalyse (3.2.8.1) charakterisiert. Die Hydrolyse wurde mit den Restriktionsendonukleasen Nhe I und Xho I durchgeführt und die entstandenen DNA-Fragmente in einem 1 %igen Agarosegel analysiert. Von den Transformanten, die das Plasmid mit der 1.700 bp Insertion trugen, wurden anschließend eine präparative Plasmidisolierung (3.2.4.2) durchgeführt. Zum Nachweis, dass durch die PCR-Amplifikation mittels der *Taq*-Polymerase keine Mutationen stattgefunden haben, wurde die Insertion von ausgewählten rekombinanten Plasmiden komplett sequenziert (3.2.11.1). Die Insertion des Plasmids mit fehlerfreier Sequenz wurde mit den Restriktionsendonukleasen Nhe I und Xho I aus dem Vektor entfernt und in die Polylinkerregion des Reportervektors pGL3-Basic über die kompatiblen Enden Nhe I und Xho I eingefügt. Das Promotortestplasmid erhielt die Bezeichnung pProm 1.700, endet im 3'-Bereich an Position +24 und im 5'-Bereich an Position -1.681 in bezug auf den Transkriptionsstartpunkt +1 (siehe Abbildung 4.19).

4.5.1.2 Konstruktion der Promotortestplasmide pProm 1.350, 970, 770, 590, 500 und 260 über *Nested Deletion* des pProm 1.700

Ausgehend von dem Promotortestplasmid pProm 1.700 konnten nun weitere 5'-Verkürzungen über die Methode der *Nested Deletion* (3.2.10) eingeführt werden. Nach diesem Verfahren erhält man ausgehend von einem rekombinanten Plasmid eine Serie von verkürzten Subklonen. Hierzu wird die zirkuläre Plasmid-DNA mit zwei Restriktionsendonukleasen hydrolysiert, so dass ein 5'-überstehendes bzw. glattes Ende (Nuklease sensibles Ende) und ein 3'-überstehendes Ende (Nuklease resistentes Ende) in der Polylinkerregion entsteht. Keines der beiden Enzyme sollte innerhalb der Insertion hydrolysieren. Die Exonuklease III baut nun das linearisierte Plasmid einzelsträngig vom 5'-Ende her ab. Indem man zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnimmt und mit Nuklease S1 den entstandenen Einzelstrang hydrolysiert, erhält man eine Population von Plasmiden mit unterschiedlichen Insertionsdeletionen. Die verkürzten DNA-Moleküle

werden mit T4-DNA-Ligase rezirkularisiert und in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Das Prinzip der *Nested Deletion* ist in Abbildung 4.11 dargestellt.

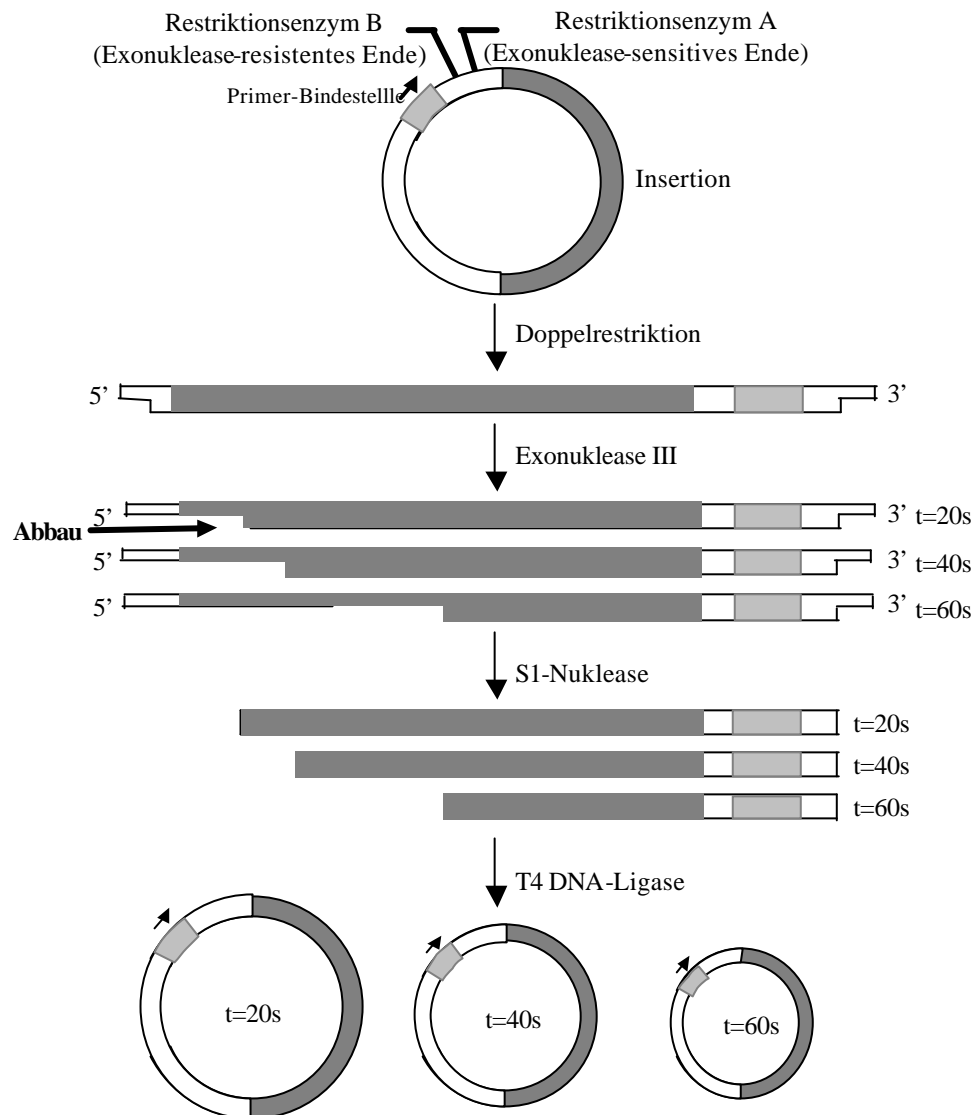


Abb. 4.11: Prinzip der Insertionsverkürzung rekombinanter Plasmide (*Nested Deletion*)

Nach geeigneter Hydrolyse des rekombinanten Plasmids erfolgt eine unidirektionale Insertionsverkürzung durch das Enzym Exonuklease III. Anschließend werden die Enden durch die S1-Nuklease geglättet und die Plasmide rezirkularisiert.

Zur Durchführung der *Nested Deletion* Reaktion wurde das zirkuläre Plasmid pProm 1.700 mit zwei Restriktionsenzymen hydrolysiert, so dass ein 5'-überstehendes Ende (Nuklease sensibles Ende) und ein 3'-überstehendes Ende (Nuklease resistentes Ende) innerhalb der Polylinkerregion entstand, wobei keines der Enzyme innerhalb der Insertion hydrolysierte. Zunächst wurden 5 µg Plasmid-DNA mit 50 U Restriktionsenzym Kpn I zur Erzeugung des 3'-überstehenden Endes hydrolysiert. Der Restriktionsansatz wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel (3.2.12.1) überprüft und über das Qiagen PCR Purification Kit gereinigt (3.2.5.3). Dann wurde das 5'-überstehende Ende durch Hydrolyse mit 50 U Nhe I

generiert. 2 µg der hydrolysierten DNA wurden in 20 µl Exonuklease III-Puffer mit 150 U Exonuklease III versetzt. Der Abbau erfolgte bei 75 mM NaCl und 25 °C, so dass etwa 100 Basen/min abgebaut wurden. Anschließend wurden in verschiedenen Zeitabständen über einen Zeitraum von 30 min jeweils 2 µl Probe entnommen und die entstandenen einzelsträngigen Enden durch Nuklease S1 hydrolysiert. Zur Überprüfung des Exonuklease III-Abbaus wurden je 2,5 µl der Proben durch Agarosegelelektrophorese analysiert (3.2.12.1) und die restlichen 2,5 µl durch das Enzym T4 DNA Ligase rezirkularisiert. Die Abbildung 4.12 zeigt die gelelektrophoretische Analyse des Exonuklease III-Abbaus.

Zur Transformation wurden je 10 µl Ligationsansätze der Zeitpunkte 30 s, 50 s, 1 min, 1,5 min, 2 min, 5 min, 10 min, und 20 min mit 200 µl kompetenten JM109 Zellen versetzt (3.2.3.2). Zur Identifizierung geeigneter Klone wurden 86 Kolonien in eine analytische Plasmidpräparation (3.2.4.1) eingesetzt und die isolierte DNA durch Linearisierung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (3.2.8.1) und folgender Agarosegelelektrophorese (3.2.12.1) auf ihre Größe hin analysiert. Geeignet erscheinende Plasmide wurden dann zur genaueren Bestimmung ihrer Insertionsgrösse sequenziert (3.2.11.1).

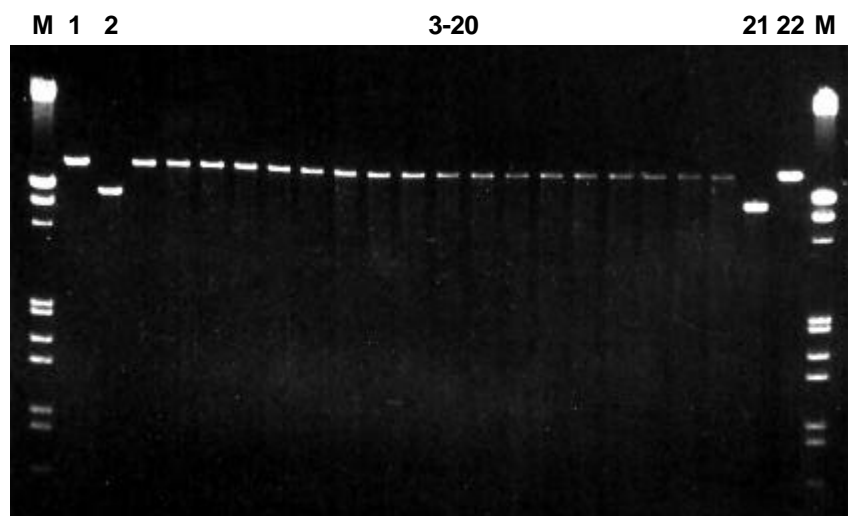


Abb. 4.12: Kinetik des Exonuklease III-Abbaus des pProm 1.700

M: Molecular Weight Marker III; Spur 1 und 22: Prom 1.700/Nhe I; Spur 2 und 21: pGL3-Basic/Nhe I; Spur 3-20: innerhalb von 30 min entnommene Proben des Exonuklease III-Abbaus; Spur 3: t = 0 s; Spur 20: t = 30 min.

Durch die Methode der *Nested Deletion* konnten sechs Reportertestplasmide dargestellt werden, die die gewünschten Insertionslängen von 1.350, 968, 768, 587, 500 und 257 Basenpaaren enthielten. Die Promotortestplasmide erhielten die Bezeichnung pProm 1.350, 970, 770, 590, 500 und 260. Sie haben ein definiertes 3'-Ende an Position +24 und enden am 5'-Ende an Position -1.327, -945, -745, -564, -477 und -234 in bezug auf den Startpunkt der Transkription mit +1 (siehe Abbildung 4.19).

4.5.1.3 Konstruktion der Promotortestplasmide pProm 160, 100 und 80 aus dem pProm 260

Ausgehend von der 260 bp Insertion des Promotortestplasmids pProm 260, die nun singuläre Restriktionsschnittstellen enthielt, konnten durch Restriktionen die weiteren 5'-Verkürzungen des Promotorinserts auf 160, 100 und 80 Basenpaaren hergestellt werden.

4.5.1.3.1 Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 160

Das Promotor-Fragment mit einer Größe von 160 bp wurde durch Restriktion des pProm 260 mit den Enzymen Pst I und Xho I erhalten. Die Restriktionsendonuklease Pst I hydrolysierte innerhalb der Insertion an Position 95 und Xho I am 3'-Ende der Insertion. Kompatible Enden für die mit Pst I erzeugte Schnittstelle zur direkten Klonierung lagen im pGL3-Basic Reportervektor nicht vor. Deshalb wurde das Promotor-Fragment über die kompatiblen Schnittstellen Pst I/Xho I zunächst in die Polylinkerregion des Plasmids pBluescript II SK(-) (3.1.12) inseriert. Anschließend wurde das Promotor-Fragment aus dem pBluescript II SK(-) Vektor mit den Enzymen Sma I und Xho I isoliert und über diese Schnittstellen in den pGL3-Basic Reportervektor (3.1.12.2) inseriert.

Zur Hydrolyse von pProm 260 wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl 2 µg pProm 260 mit 20 U Pst I und 20 U Xho I in einem entsprechenden Restriktionspuffer bei 37 °C für 2 h inkubiert. Parallel hierzu wurden 2 µg des pBluescript II SK(-) in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit jeweils 20 U Pst I und Xho I ebenfalls für 2 h bei 37 °C hydrolysiert. Die Restriktionsansätze wurden in einem 1 %igen Agarosegel überprüft (3.2.12.1) und über das PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt. Zur Ligation der DNA-Fragmente wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl 50 ng hydrolysiertes pBluescript II SK(-) mit 100 ng hydrolysiertem pProm 260 für 2 h bei RT ligiert (3.2.8.3). Der Ligationsansatz wurde in kompetente *E. coli* JM109 Zellen transformiert (3.2.3.2). Von 15 Transformanten wurde eine analytische Plasmidpräparation (3.2.4.1) durchgeführt und diese durch Restriktion mit geeigneten Enzymen und anschließender Agarosegelelektrophorese analysiert (3.2.12.1). Zwei der Plasmide enthielten das gewünschte Insert in dem pBluescript II SK (-) Vektor. Von diesen beiden Transformanten wurde eine präparative Plasmidisolierung nach Qiagen (3.2.4.2) durchgeführt und die Basenabfolge durch Sequenzierung (3.2.11.1) bestimmt.

Zur Umklonierung des 160 bp Fragmentes in den pGL3-Basic Vektor wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl jeweils 1 µg rekombinanter pBluescript II SK (-) und pGL3-Basic mit 20 U Sma I für 2 h bei 25 °C hydrolysiert. Anschließend wurde zu den Ansätzen jeweils 20 U Xho I zugegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsansätze wurden

gelelektrophoretisch analysiert (3.2.12.1) und über das PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt. Zur Ligation wurden 0,7 pmol hydrolysiertes pGL3-Basic und 2 pmol des 160 bp Fragmentes mit 7 U T4 DNA Ligase versetzt und 2 h bei RT inkubiert (3.2.8.3). Der Ansatz wurde in kompetente JM109 Zellen transformiert (3.2.3.2) und von 24 Transformanten analytische Plasmidpräparationen durchgeführt (3.2.4.1). Die isolierten Plasmide wurden mit den Restriktionsendonukleasen Sma I und Xho I hydrolysiert und gelelektrophoretisch analysiert (3.2.12.1). Drei der 24 Transformanten enthielten den pGL3-Basic Vektor mit der Insertion von 160 bp. Von diesen Transformanten wurde eine präparative Plasmidisolierung (3.2.4.2) durchgeführt und der Insertbereich sequenziert (3.2.11.1). Das Promotortestplasmid erhielt die Bezeichnung pProm 160. Es umfasst 163 bp der Promotorregion mit dem 3'-Ende an Position +24 und dem 5'-Ende an Position -140 in bezug auf den Startpunkt der Transkription +1 (siehe Abbildung 4.19).

4.5.1.3.2 Konstruktion des Promotortestplasmids 100

Die Darstellung des Promotor-Fragmentes mit einer Größe von 100 bp wurde durch Restriktion von pProm 260 mit den Restriktionsendonukleasen Sac I und Xho I und anschließender Ligation mit den kompatiblen Enden des pGL3-Basic Vektors erzielt.

Zur Hydrolyse von pProm 260 und pGL3-Basic wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 20 µl 2 µg der Plasmide mit 20 U Sac I und Xho I versetzt und unter entsprechenden Pufferbedingungen für 2 h bei 37 °C inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde gelelektrophoretisch analysiert (3.2.12.1) und durch Phenolextraktion (3.2.5.1) mit anschließender Ethanol-Fällung (3.2.5.2) gereinigt. Die Ligation erfolgte wie unter Punkt 3.2.8.3 beschrieben mit 7 U T4 DNA Ligase für 2 h bei RT. Der Ansatz wurde in kompetente *E. coli* JM109 Zellen transformiert (3.2.3.2). Es wurden 15 analytische Plasmidisolierungen (3.2.4.1) durchgeführt, diese mit den Enzymen Sac I und Xho I hydrolysiert und gelelektrophoretisch analysiert (3.2.12.3). Drei der Transformanten enthielten die Insertion von 100 bp im pGL3-Basic Vektor. Von diesen Transformanten wurde eine präparative Plasmidisolierung durchgeführt (3.2.4.2) und die Sequenz bestimmt (3.2.11.1). Das Promotortestplasmid erhielt die Bezeichnung pProm 100. Es umfasst 101 bp der Promotorregion mit dem 3'-Ende an Position +24 und dem 5'-Ende an Position -78 in bezug auf den Startpunkt der Transkription mit +1 (siehe Abbildung 4.19).

4.5.1.3.3 Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 80

Zur Herstellung von pProm 80 wurde das Promotortestplasmid pProm 260 mit den Restriktionsendonukleasen Hae III und Xho I hydrolysiert. Das Enzym Hae III erzeugt glatte Enden und trug mehrere Erkennungssequenzen innerhalb der Insertion und des Vektors, so dass insgesamt 8 DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe entstanden. Durch Restriktion innerhalb der Polylinkerregion des Plasmids pGL3-Basic mit den Enzymen Xho I und Ecl136 II konnte das Promotor-Fragment in den Vektor kloniert werden. Ecl136 II hat dieselbe Erkennungssequenz wie das Restriktionsenzym Sac I, erzeugt aber glatte Enden.

2 µg des Plasmids pProm 260 wurden jeweils mit 20 U Hae III und Xho I für 2 h bei 37 °C inkubiert. Parallel hierzu wurden 2 µg des pGL3-Basic Vektors mit jeweils 20 U Ecl136 II und Xho I bei 37 °C inkubiert. Der Restriktionsansatz pProm 260/Hae III/Xho I wurde durch Phenolextraktion (3.2.5.1) und Ethanol-Fällung (3.2.5.2) und der Restriktionsansatz pGL3-Basic/Ecl136 II/Xho I über das PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt. Zur Ligation wurden 0,4 pmol Restriktionsansatz pProm 260 und 0,1 pmol pGL3-Basic eingesetzt und 2 h bei RT inkubiert (3.2.8.3). Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* JM109 Zellen transformiert (3.2.3.2) und 18 Transformaten wie unter Punkt 3.2.4.1 beschrieben präpariert. Die Plasmide wurden mit entsprechenden Enzymen restringiert und gelelektrophoretisch analysiert (3.2.12.1). Zwei der Transformaten enthielten das gewünschte Plasmid mit der 80 bp Insertion. Von diesen Transformanten wurde eine präparative Plasmidisolierung (3.2.4.2) durchgeführt und die Basenabfolge durch Sequenzierung (3.2.11.1) bestimmt. Das Promotortestplasmid erhielt die Bezeichnung pProm 80. Es umfasst 82 bp der Promotorregion mit dem 3'-Ende an Position +24 und dem 5'-Ende an Position -59 in bezug auf den Startpunkt der Transkription +1 (siehe Abbildung 4.19).

4.5.1.4 Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 2.080

Die Promotorregion im Bereich 2.000 bp stromaufwärts und 24 bp stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes enthielt keine geeigneten Restriktionsschnittstellen zur Klonierung dieses Fragmentes in die Polylinkerregion des pGL3-Basic Reportervektors (3.1.12.2).

Zur Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 2.080 wurde daher ein 485 bp großes DNA-Fragment aus dem Subklon pSG08 (Insertionsgröße 766 bp, Perl 1996) des Gens 83.5 isoliert und in pProm 1.700 inseriert. pProm 1.700 wurde somit in 5'-Richtung um 485 bp erweitert und das Promotorkonstrukt pProm 2.080 erzeugt. Das Klonierungsschema ist in Abbildung 4.13 skizziert. Durch geeignete Wahl der Restriktionsenzyme wurde

sicher gestellt, dass das DNA-Fragment in genomischer Orientierung in den pProm 1.700 inseriert wurde.

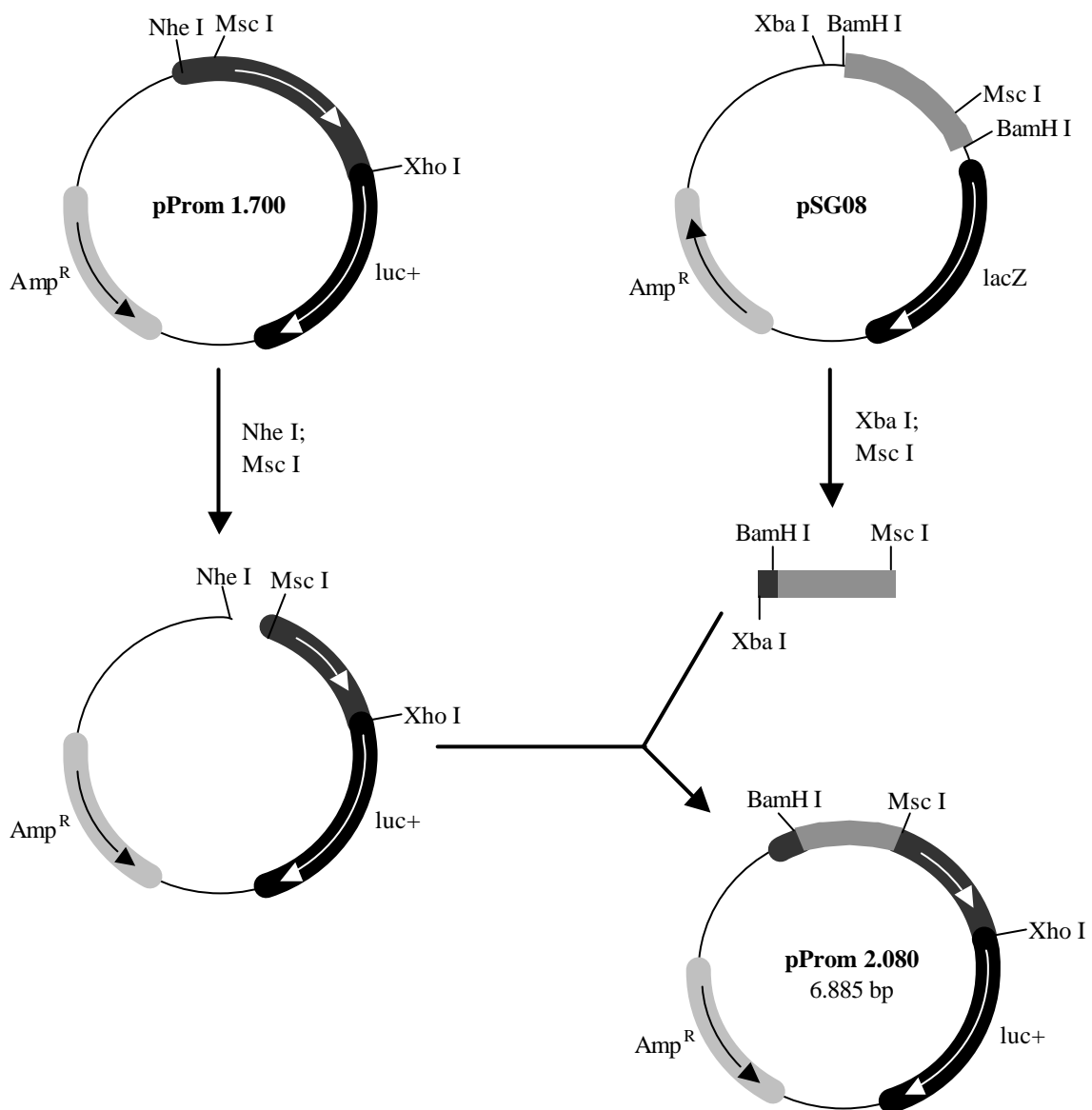


Abb. 4.13: Darstellung des Promotortestplasmids pProm 2.080

Durch Hydrolyse des pSG08 mit Xba I und Msc I wurde ein 485 bp langes Promotorfragment erhalten, das über die kompatiblen Enden Nhe I und Msc I in den pProm 1.700 inseriert wurde.

Zur Hydrolyse des pSG08 wurden 5 µg des Plasmids in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 20 U Xba I und 15 U Msc I über Nacht bei 37 °C inkubiert (3.2.8.1). Parallel hierzu wurden 5 µg pProm 1.700 mit 20 U Nhe I und 15 U Msc I über Nacht bei 37 °C hydrolysiert. Die Restriktionsansätze wurden gelelektrophoretisch analysiert (3.2.12.1) und über das PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt. 0,1 pmol des linearisierten und im 5'-Bereich durch Nhe I und Msc I um 115 bp verkürzten pProm 1.700 wurden bei 4 °C über Nacht mit 0,2 pmol des fragmentierten pSG08 ligiert (3.2.8.3) und in *E. coli* JM109 Zellen transformiert (3.2.3.2). 48 Transformanten wurden einer analytische Plasmidisolierung

(3.2.4.1) unterzogen und neun der Transformanten enthielten das Plasmid pProm 2.080. Von diesen wurde eine präparative Plasmidisolierung (3.2.4.2) durchgeführt und die Sequenz wie unter Punkt 3.2.11.1 beschrieben bestimmt. Das Promotortestplasmid erhielt die Bezeichnung pProm 2.080. Es umfasst 2.077 bp der Promotorregion mit dem 3'-Ende an Position +24 und dem 5'-Ende an Position -2.053 in bezug auf den Startpunkt der Transkription mit +1 (siehe Abbildung 4.19).

4.5.1.5 Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 4.350

Die Promotorregion 4.350 bp stromaufwärts und 24 bp stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes enthielt ebenfalls keine geeigneten Restriktionsschnittstellen zur direkten Klonierung des kompletten Promotors in die Polylinkerregion des pGL3-Basic Reportervektors. Zur Konstruktion des Wildtyp-Promotors pProm 4.350 diente pProm 1.700 (4.3.1.1) als Ausgangsvektor. Zunächst wurde über ein synthetisches doppelsträngiges DNA-Fragment, einem sogenannten Linker, die benötigten Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme in pProm 1.700 eingeführt. Zur Erzeugung des Linkers wurden zwei komplementäre Oligonukleotide (3.1.14.2) wie unter Punkt 3.2.17.1 beschrieben hybridisiert, so dass ein doppelsträngiges DNA-Fragment mit folgender Struktur entstand (Abb. 4.14).

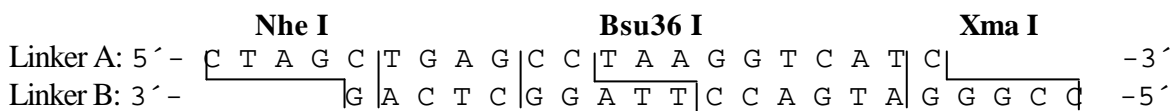


Abb. 4.14: Struktur und Sequenz des Linkers

Dieser Linker wurde über die Nhe I und Xma I 5'-überstehenden Enden an das 5'-Ende von pProm 1.700, der zuvor mit denselben Enzymen hydrolysiert wurde, ligiert. Ein 3.480 bp Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen Bsu36 I und Xma I aus dem Subklon pTB22 isoliert und über die kompatiblen Enden in den pProm 1.700 kloniert. Das Klonierungsschema zur Herstellung des pProm 4.350 ist in Abbildung 4.15 dargestellt.

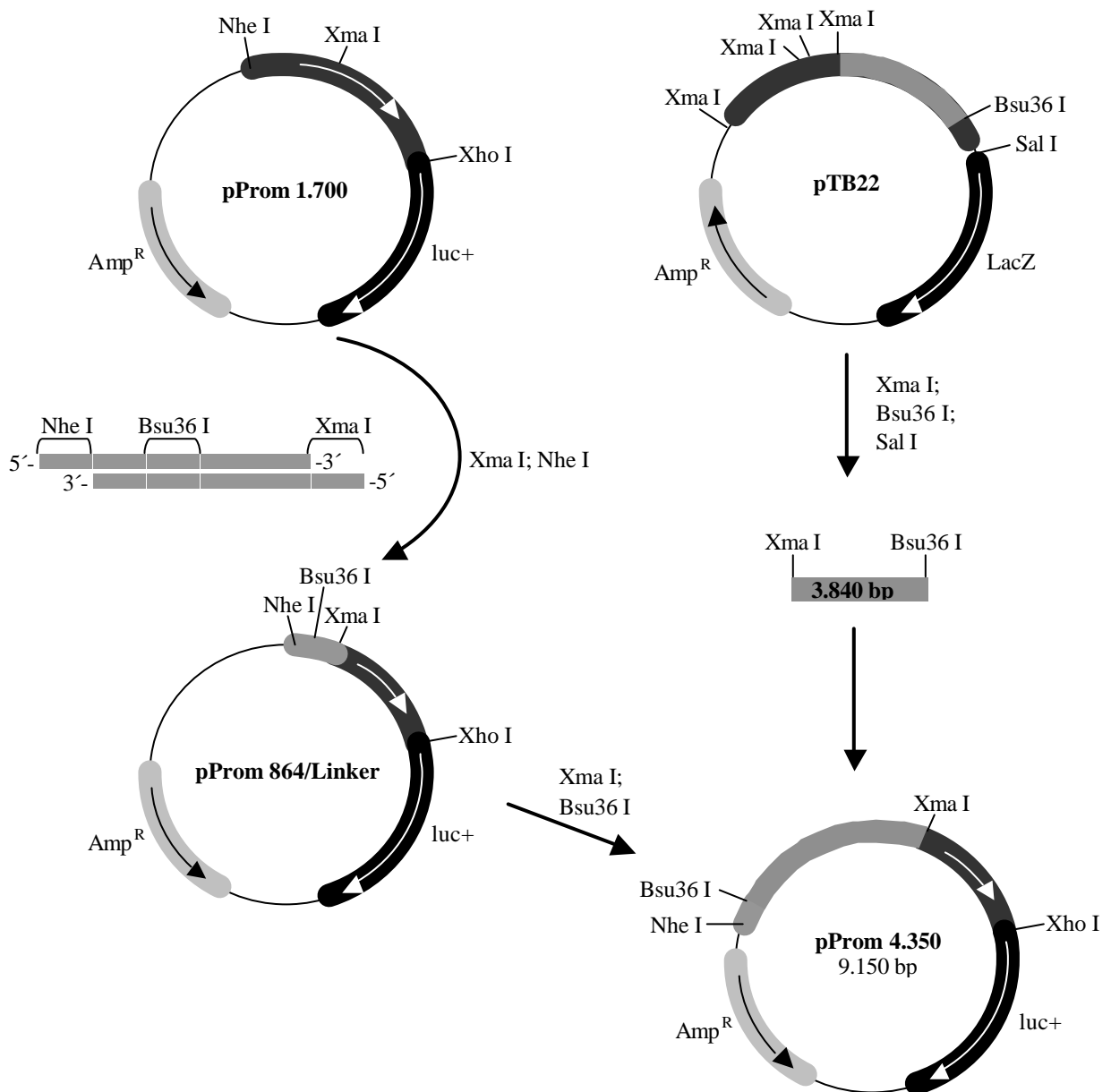


Abb. 4.15: Darstellung des Promotortestplasmids pProm 4.350

Durch Hydrolyse des pProm 1.700 mit Xma I und Nhe I wurde der 5'-Bereich des Promotors um 843 bp verkürzt und der Linker konnte über kompatible Enden inseriert werden, wodurch der pProm 864/Linker erhalten wurde. Nach Hydrolyse des pProm 864/Linker mit Bsu36 I und Xma I wurde das durch Hydrolyse des pTB22 mit Bsu36 I, Xma I und Sal I erhaltene 3.840 bp Promotor-Fragment inseriert.

Zur Insertion des Linkers wurden 5 µg des pProm 1.700 mit 30 U Nhe I für 6 h bei 37 °C und anschließend mit 6 U Xma I über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Restriktion wurde gelelektrophoretisch überprüft (3.2.12.1). Durch die Restriktionen wurde das Promotorfragment im 5'-Bereich um 843 bp verkürzt. Es folgte die Reinigung des Restriktionsansatzes über das PCR Purification Kit (3.2.5.3). 0,2 pmol des verkürzten Vektors wurden mit 0,6 pmol des Linkers wie in Punkt 3.2.8.3 beschrieben über Nacht bei 4 °C ligiert und in *E. coli* JM109 Zellen transformiert (3.2.3.2).

4,5 µg des Subklons pTB22 wurden mit 30 U Bsu36 I und 9 U Xma I bei 37 °C über Nacht hydrolysiert. Um die Religation des Vektors zu vermeiden, wurde anschließend mit 40 U Sal I für 2 h bei 37 °C inkubiert und die Restriktionen in einem Agarosegel überprüft (3.2.12.1). Parallel hierzu wurden 5 µg des pProm 864/Linker mit 6 U Xma I und 20 U Bsu36 I bei 37 °C über Nacht hydrolysiert. Beide Restriktionsansätze wurden über das PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt. 0,2 pmol des pProm 864/Linker wurden mit 0,3 pmol des Promotorfragmentes 3.480 bei 4 °C über Nacht ligiert (3.2.8.3) und in *E. coli* JM109 Zellen transformiert (3.2.3.2). Die Plasmide der Transformanten wurden wie unter Punkt 3.2.4.1 beschrieben präpariert, mit entsprechenden Enzymen hydrolysiert und gelelektrophoretisch analysiert (3.2.12.1). Zwei der Transformanten enthielten das gewünschte Plasmid mit der 4.350 bp Insertion. Von diesen Transformanten wurde eine präparative Plasmidisolierung (3.2.4.2) durchgeführt und die Basenabfolge vom 5'- und 3'-Ende her durch Sequenzierung bestimmt (3.2.11.1).

Das Promotortestplasmid erhielt die Bezeichnung pProm 4.350. Es umfasst 4.344 bp der Promotorregion mit dem 3'-Ende an Position +24 und dem 5'-Ende an Position -4.321 in bezug auf den Startpunkt der Transkription +1 (siehe Abbildung 4.19).

4.5.1.6 Konstruktion des Wildtyp-Promotors einschließlich der 5'-nichttranslatierten Region pProm 4.350/UTR

Die direkte Klonierung des 5'-UTR in das Promotortestplasmid pProm 4.350 war aufgrund fehlender singulärer Restriktionsschnittstellen nicht möglich. Zur Herstellung des Promotortestplasmids musste zunächst ein 3.611 bp langes DNA-Fragment aus dem Subklon pTB22 (Bangsow, 1996) mit den Restriktionsendonukleasen Spe I und Sac II erhalten werden, das über kompatible Enden in den Polylinker des Plasmids pBluescript II SK(-) (3.1.12) eingefügt wurde. Dieses DNA-Fragment erstreckt sich von Position - 2.622 bis + 989 bezogen auf den Startpunkt der Transkription +1. Anschließend wurde es mit den Restriktionsenzymen Sac II und Xho I aus dem Vektor entfernt und in das Plasmid mit dem Wildtyp-Promotor pProm 4.350 über kompatible Enden kloniert. Das Klonierungsschema zur Darstellung des pProm 4.350/UTR ist in Abbildung 4.16 gezeigt.

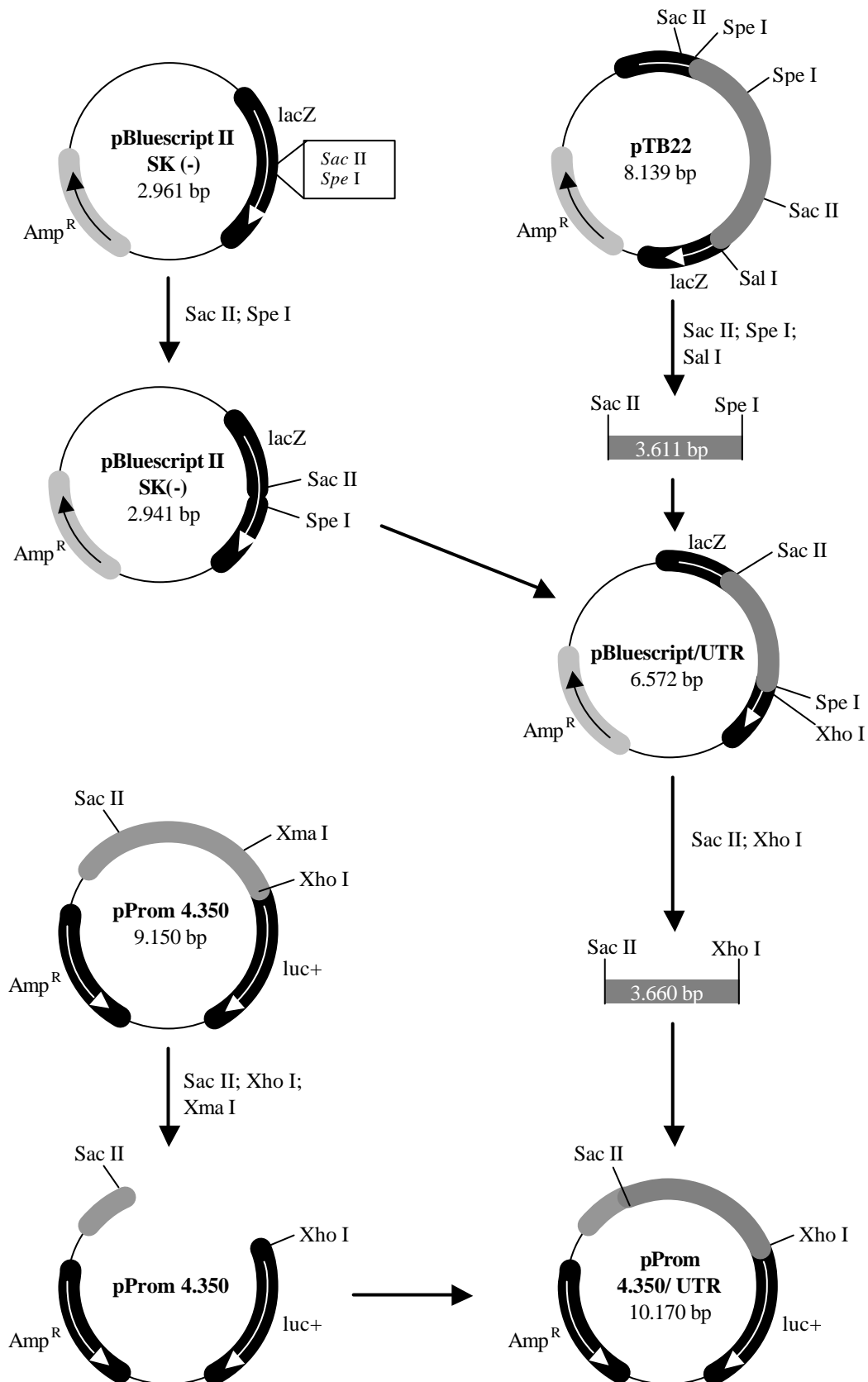


Abb. 4.16: Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 4.350/UTR

Der 3'-Bereich einschließlich des 5'-UTR zur Darstellung des pProm 4.350/UTR wurde aus dem Subklon pTB 22 durch Hydrolyse mit Sac II und Spe I erhalten. Dieses 3.611 bp lange Promotor-Fragment wurde zunächst in den pBluescript II SK(-) Vektor kloniert und durch Hydrolyse mit Sac II und Xho I über kompatible Enden in den pProm 4.350 inseriert.

Zur Hydrolyse des pTB22 wurden 3 µg des Plasmids mit jeweils 30 U Sac II und Spe I für 2 h bei 37 °C hydrolysiert, gelelektrophoretisch analysiert (3.2.12.1) und über das QIAquick PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt. Um die Religation des Vektors zu verhindern, wurde der Ansatz mit 30 U Sal I für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend ebenfalls über das PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt. 3 µg des Vektors pBluescript II SK(-) (3.1.12) wurden jeweils mit 30 U Sac II und Spe I für 2 h bei 37 °C hydrolysiert und nach gelelektrophoretischer Analyse (3.2.12.1) über das PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt. Jeweils 100 ng des hydrolysierten pTB22 und pBluescript II SK (-) wurden wie unter Punkt 3.2.8.3 beschrieben ligiert und in *E. coli* JM109 Zellen transformiert (3.2.3.2). Von 48 Transformanten wurden die Plasmide präpariert (3.2.4.1) und nach entsprechender Restriktion gelelektrophoretisch analysiert (3.2.12.1). 11 Transformanten enthielten die gewünschte Insertion von 3.611 bp und wurden pBluescript/UTR bezeichnet. Von zwei Transformanten wurde eine präparative Plasmidisolierung (3.2.4.2) durchgeführt.

Zur Umklonierung des DNA-Fragmentes in das Promotortestplasmid pProm 4.350 wurden 3 µg pBluescript/UTR mit jeweils 30 U Sac II und Xho I unter entsprechenden Pufferbedingungen für 2 h bei 37 °C inkubiert. Parallel hierzu wurden 5 µg pProm 4.350 mit jeweils 40 U Sac II und Xho I inkubiert. Die Restriktionsansätze wurden gelelektrophoretisch analysiert (3.2.12.1) und über das PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt. Um eine Religation beider Vektoren zu verhindern wurden der hydrolysierte pBluescript/UTR mit Alkalischer Phosphatase 5'-dephosphoryliert (3.2.8.2.5) und der pProm 4.350 mit 30 U Xma I hydrolysiert und anschließend über das PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt. Zur Ligation wurden 1 pmol hydrolysierter pProm 4.350 und 3 pmol pBluescript/UTR über Nacht bei 4 °C inkubiert und in *E. coli* JM109 Zellen transformiert (3.2.3.2). Von 48 Transformanten wurde eine analytische Plasmidisolierung (3.2.4.1) durchgeführt. Zwei Transformanten enthielten das gewünschte Insert, von diesen wurde eine präparative Plasmidisolierung nach Qiagen durchgeführt (3.2.4.2) und sequenziert (3.2.11.1). Das Promotortestplasmid erhielt die Bezeichnung pProm 4.350/UTR. Es umfasst 5.315 bp der Promotorregion mit dem 3'-Ende an Position +994 und dem 5'-Ende an Position -4.321 in bezug auf den Startpunkt der Transkription +1 (siehe Abbildung 4.19).

4.5.1.7 Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 100/UTR

Zur Klonierung des 5'-nichttranslatierten Bereichs (5'-UTR) in den Reportervektor pGL3-Basic (3.1.12.2) wurde der Subklon pSG04/ND08 des Gens 83.5 (Perl, 1996) verwendet, dessen Insertion sich 99 bp stromaufwärts und 1.504 bp stromabwärts vom Transkriptionsstartpunkt erstreckt und singuläre Restriktionsschnittstellen zur Klonierung der 5'-UTR in den pGL3-Basic Vektor enthält. Hierzu wurde der pSG04/ND08 mit den Restriktionsendonukleasen Sac I und Hind III hydrolysiert. Sac I hydrolysiert an Position -78 und Hind III an Position + 805 bezogen auf den Startpunkt der Transkription mit +1. Das entstandene DNA-Fragment enthielt somit den Promotorbereich für die basale Transkription sowie 214 bp codierender Gensequenz. Das Klonierungsschema ist in Abbildung 4.17 dargestellt.

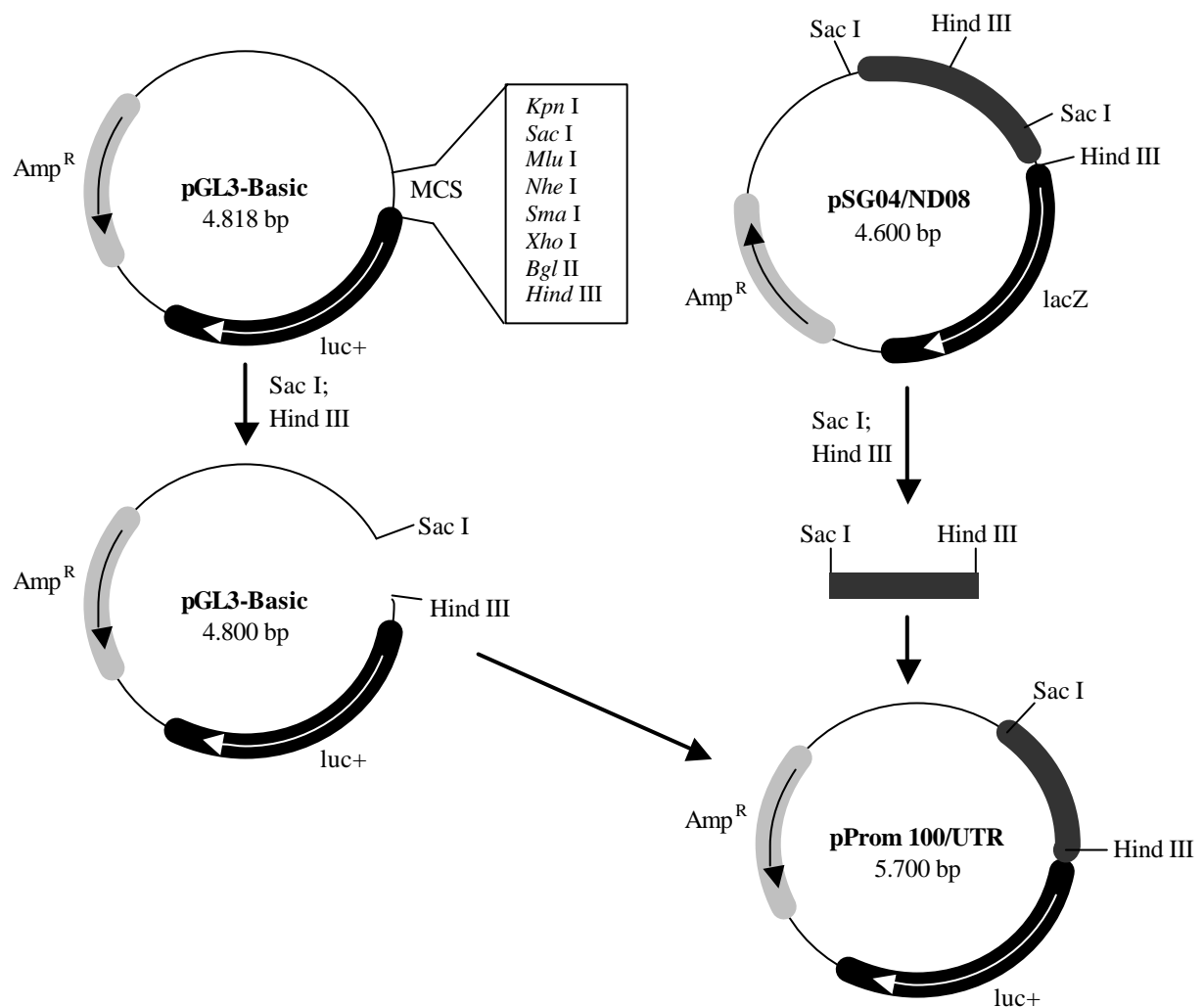


Abb 4.17: Konstruktion des Promotortestplasmids pProm 100/UTR

Das Promotorkonstrukt pProm 100/UTR wurde durch Hydrolyse des Subklons pSG04/ND08 und Insertion des 883 bp langen Fragmentes über die kompatiblen Enden Sac I und Hind III in den pGL3-Basic Vektor erhalten.

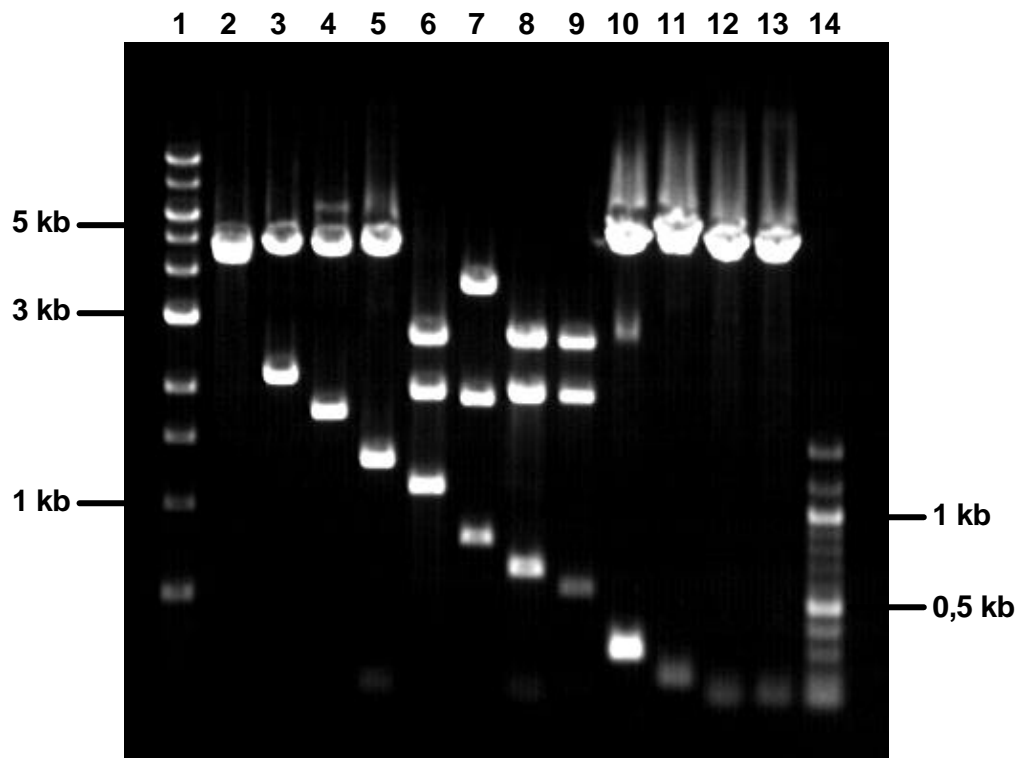
3 µg des Subklons pSG04/ND08 wurden mit jeweils 30 U Sac I und Hind III in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 2 h bei 37 °C hydrolysiert (3.2.8.1). Entsprechend wurden 3 µg pGL3-Basic Vektor (3.1.12.2) inkubiert. Die Restriktionsansätze wurden in einem 1 %igen Agarosegel (3.2.12.1) analysiert und über das PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt. Zur Ligation (3.2.8.3) wurden 1 pmol restringierter pGL3-Basic und 3 pmol pSG04/ND08 eingesetzt, über Nacht bei 4 °C inkubiert und in *E. coli* JM109 Zellen transformiert (3.2.3.2). Von 72 Transformanten wurde eine analytische Plasmidisolierung (3.2.4.1) durchgeführt. Die isolierten Plasmide mit entsprechenden Enzymen hydrolysiert und die Restriktionsfragmente gelelektrophoretisch analysiert (3.2.12.1). Zwei Plasmide enthielten die gewünschte Insertion von 876 bp. Von diesen Transformanten wurde eine präparative Plasmidisolierung durchgeführt (3.2.4.2) und diese wie unter Punkt 3.2.11.1 beschrieben sequenziert.

Das Promotortestplasmid erhielt die Bezeichnung pProm 100/UTR. Es umfasst 883 bp der Promotorregion mit dem 3'-Ende an Position +805 und dem 5'-Ende an Position -78 in bezug auf den Startpunkt der Transkription +1 (siehe Abbildung 4.19).

4.5.2 Charakterisierung der konstruierten Promotortestplasmide nach Restriktionsanalyse

Die Längen der inserierten Promotor-Fragmente in den Reportervektor pGL3-Basic (3.1.12.2) wurde durch Hydrolyse der erzeugten Promotortestplasmide mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen bestimmt (3.2.8.1). Die Restriktions-Fragmente wurden über ein 0,8 %iges Agarosegel elektrophoretisch (3.2.12.1) getrennt und sind in Abbildung 4.18 zusammenfassend dargestellt.

A)



B)

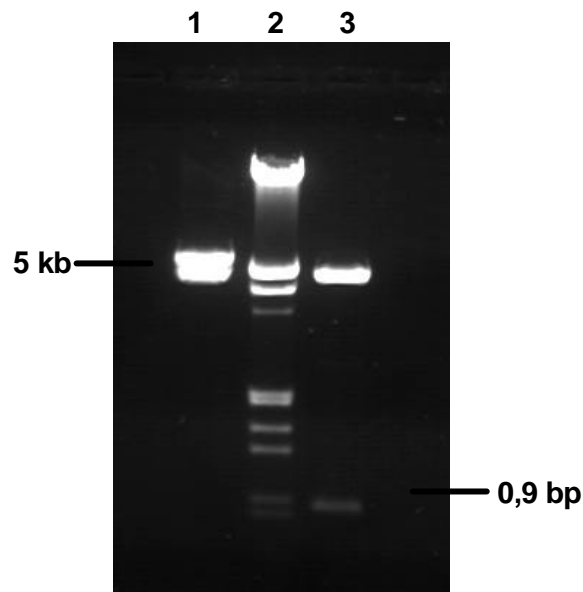


Abb. 4.18: Gelelektrophoretische Analyse der Promotortestplasmide des Promotors *tnp 83.5*

Die Testplasmide wurden mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und die erhaltenen Fragmente anschließend über ein 0,8 %iges Agarosegel elektrophoretisch getrennt.

A): Spur 1: 1 kb DNA Leiter; Spur 2: pProm 4.350 hydrolysiert mit Nhe I und Xho I; Spur 3: pProm 2.080 hydrolysiert mit Esp I und Xho I; Spur 4: pProm 1.700 hydrolysiert mit Nhe I und Xho I; Spur 5: pProm 1.350 hydrolysiert mit Sac I und Xho I; Spur 6: pProm 970 hydrolysiert mit Cla I und Xho I; Spur 7: pProm 770 hydrolysiert mit Xmn I und Xho I; Spur 8: pProm 590 hydrolysiert mit Cla I und Xho I; Spur 9: pProm 500 hydrolysiert mit Cla I und Xho I; Spur 10: pProm 260 hydrolysiert mit Acc65 I und Xho I; Spur 11: pProm 160 hydrolysiert mit Nhe I und Xho I; Spur 12: pProm 100 hydrolysiert mit Acc65 I und Xho I; Spur 13: pProm 80 hydrolysiert mit Acc65 I und Xho I; Spur 14: 100 bp DNA Leiter.

B): Spur 1: pProm 4.350/UTR hydrolysiert mit Sac II und Xho I; Spur 2: Molecular Weight Marker III; Spur 3: pProm 100/UTR hydrolysiert mit Sac I und Hind III.

4.5.3 Charakterisierung der Promotortestplasmide durch DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Promotortestplasmide wurde nach der von Sanger beschriebenen Kettenterminationmethode (3.2.11.1) durchgeführt.

Die bei der PCR-Amplifikation des pProm 1.700 eingesetzte *Taq*-Polymerase besitzt keine 3'→5'-Exonukleaseaktivität, so dass falsch eingebaute Nukleotide nicht hydrolytisch entfernt werden. Um mögliche Mutationen, die durch die PCR-Amplifikation stattgefunden haben, identifizieren zu können, wurde dieses PCR-Fragment komplett sequenziert. Als Primer für die Synthesereaktion wurden die Universalprimer SP6 und T7 sowie die sequenzspezifischen Oligonukleotide SM1, SM2, SM2b, SM3, SG01, SG02, SG07 und EK02 (3.1.14.2) verwendet. Mit den Universalprimern SP6 und T7 erfolgte die Sequenzierung von beiden Seiten der Polylinkerregion des Plasmids pGEM-T (3.1.12.4) in die 1.700 bp lange Insertion. Die sequenzspezifischen Primer lieferten die komplette Sequenzinformation der Insertion. Von drei Plasmiden mit der Insertion pProm 1.700 war eines mit fehlerfreier Sequenz. Dies wurde dann wie unter Punkt 4.5.1.1 beschrieben in den Reportervektor pGL3-Basic (3.1.12.2) kloniert und in die Transfektionsstudien (4.6) eingesetzt.

Die Promotortestplasmide pProm 1.350, 970, 770, 590, 500 und 260, welche über die Methode der *Nested Deletion* alle aus dem pProm 1.700 entstanden sind, wurden mit den Universalprimern RV3 und GL2 (3.1.14.2) ausgehend von der Polylinkerregion des pGL3-Basic Vektors von beiden Seiten sequenziert. Die übrigen Promotortestplasmide pProm 4.350, 4.350/UTR, 2.080, 100/UTR, 160, 100 und 80 wurden durch Klonierung von DNA-Fragmenten erhalten und dementsprechend nicht komplett sequenziert, sondern mit den Universalprimern RV3 und GL2 (3.1.14.2) vom 5'- und 3'-Ende her sequenziert.

Die Bezeichnung der einzelnen Promotortestplasmide und eine schematische Darstellung der inserierten Sequenzen ist in Abbildung 4.19 aufgeführt.

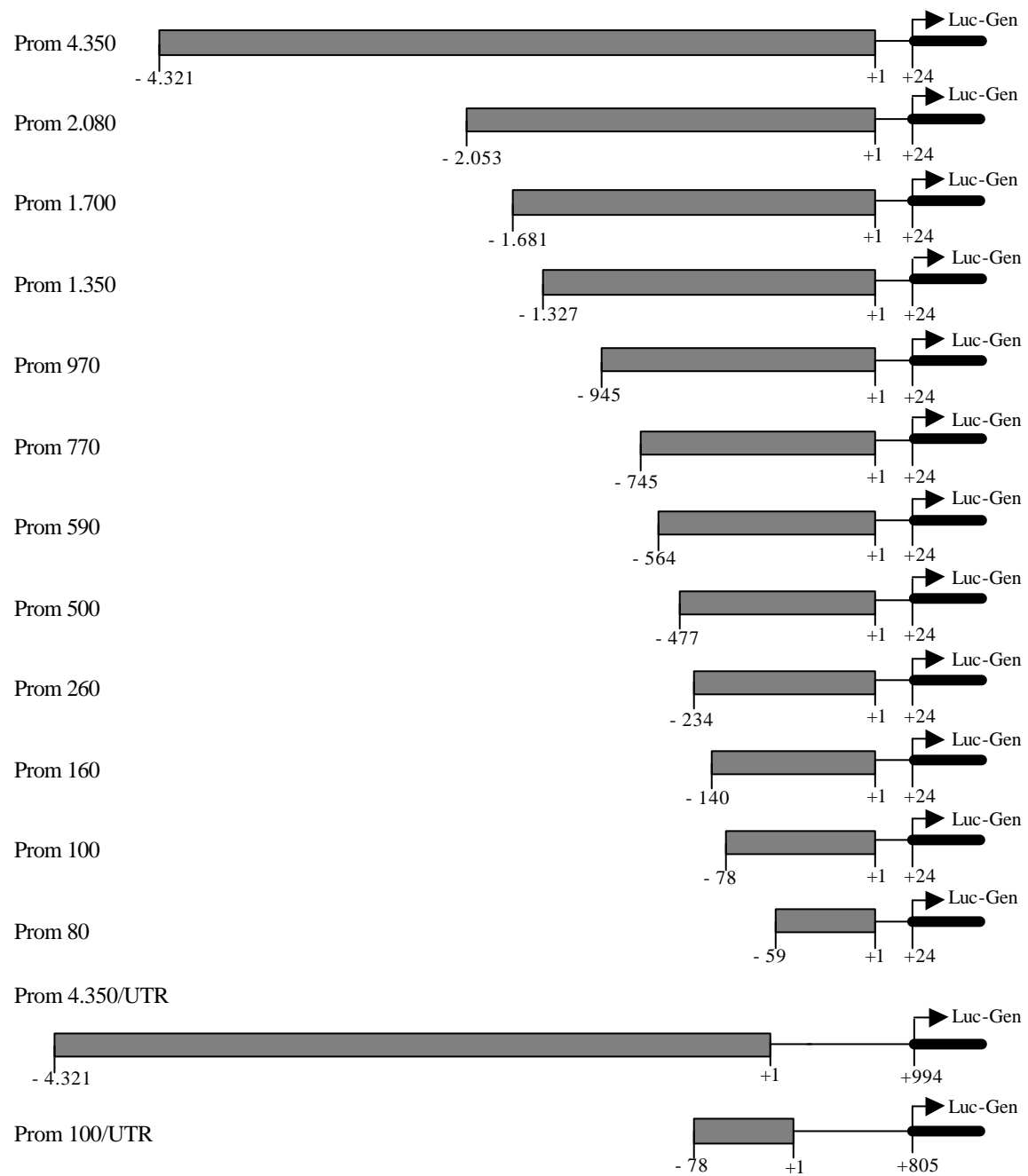


Abb. 4.19: Schematische Darstellung der charakterisierten Promotortestplasmide.

Der Transkriptionsstartpunkt ist mit +1 gekennzeichnet. Alle Promotorfragmente besitzen ein definiertes 3'-Ende an der Position +24. Die Position des 5'-Endes des jeweiligen Promotorkonstrukts ist angegeben. Die beiden Promotorfragmente pProm 4350/UTR und pProm 100/UTR enthalten den 5'-nichttranslatierten Bereich. An das 3'-Ende der Promotorbereiche schliesst sich das Luciferase-Gen (Luc-Gen) an.

4.6 Transiente Transfektion der Promotortestplasmide in die Zelllinien BHK 21, SK-N-SH und Neuro-2a

Für die Analyse funktioneller Sequenzelemente im Promotor *tmp* 83.5 wurden transiente Transfektionen mit den unter Punkt 4.5.1 bzw. in Abbildung 4.19 dargestellten Promotortestplasmiden durchgeführt. Zur Identifizierung von regulatorischen cis-Elementen, die für die korrekte zeitliche und räumliche neuronale bzw. gehirnspezifische Expression des Gens 83.5 verantwortlich sind, wurden die Promotortestplasmide in neuronale Säugerzellen transfiziert. Um eine erfolgreiche Kultivierung und Transfektion der Zellen zu gewährleisten, wurden bereits etablierte Zelllinien verwendet. Transfiziert wurden die neuronalen Zelllinien Neuro-2a, SK-N-SH und die mit NGF differenzierte Zelllinie PC-12 (3.1.13). Parallel zur Transfektion der neuronalen Zelllinien wurde eine nichtneuronale Zelllinie mit den Promotortestplasmiden transfiziert. Der Vergleich der Expression der Promotortestplasmide in beiden Zelltypen ermöglicht die Identifizierung von Regionen mit neuronal-spezifischen Promotorelementen. In diesem Fall tritt eine Veränderung der Expressionshöhe in Abhängigkeit von der zunehmenden 5'-Deletion nur in der neuronalen Zelllinie auf, nicht aber in der nichtneuronalen Zelllinie. Treten entsprechende Veränderungen sowohl in der neuronalen als auch in der nichtneuronalen Zelllinie auf, handelt es sich um nicht-zellspezifische Elemente innerhalb der deletierten Region im Promotortestplasmid. Ausgewählt wurde die Nierenfibroblastenzelllinie BHK 21 (3.1.13), da RT-PCR Analysen und histologische Untersuchungen (Bangsow, 1998) zeigten, dass die mRNA *tmp* 83.5 nicht in der Niere gebildet wird. Weiterhin ist diese Zelllinie relativ leicht zu transfizieren und erreicht in Transfektionsversuchen hohe Expressionsraten (Singhal und Huang, 1994; Teifel, 1996).

Mittlerweile stehen eine Vielzahl verschiedener Methoden und Transfektionsreagenzien zur Verfügung um rekombinierte DNA in kultivierte Säugerzellen einzuschleusen. Da es unter den verfügbaren Transfektionsreagenzien große Unterschiede bezüglich Toxizität und Effektivität gibt, musste zunächst eine Auswahl getroffen und eine Optimierung der Versuchsparameter durchgeführt werden. Deshalb wurde für jede Zelllinie experimentell festgestellt, mit welcher Methode und welchem Transfektionsreagenz sich eine optimale Transfektionseffizienz erzielen lässt. Anschließend wurde noch das optimale Verhältnis DNA zu Transfektionsreagenz und die Expressionsdauer ermittelt.

Eingesetzt wurden die Transfektionsreagenzien DDAB/ α -Phosphatidylcholin (Teifel, 1996), LipofectAMINE (Gibco BRL), SuperFect (Qiagen) und FuGENETM 6 (Boehringer). LipofectAMINE ist ein kationisches Lipid, das hauptsächlich aus dem polykationischen Lipid DOSPA und DOPE besteht und unilamellare Liposomen bildet. Die Oberfläche der Liposomen ist positiv geladen und tritt so in Wechselwirkung mit der DNA und der Oberfläche der Zellmembran. SuperFect besteht aus sogenannten aktivierten Dendrimeren.

Dies sind stark verzweigte, kugelförmige Moleküle an deren Oberfläche sich positiv geladene Aminogruppen befinden. Die DNA lagert sich um diese aktivierten Dendrimere, in ähnlicher Weise wie um die Histone im eukaryontischen Zellkern. FuGENETM 6 ist eine Mischung von Lipiden, deren Formulierung vom Hersteller nicht genannt wird, aber keine Liposomen ausbildet.

Bei allen Versuchen wurden zur Aussaat vitale Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit einer Aussaatdichte von 10^4 - 10^5 Zellen/cm² ausgesät. Der eigentliche DNA-Transfer erfolgte einen Tag nach der Aussaat, so dass die Zellen bei Erreichen von 70-80 % Konfluenz transfiziert wurden. Durch Variation der übrigen Versuchsparameter wurden die für den jeweiligen Zelltyp optimalen Transfektionsbedingungen ermittelt. Für die Transfektion verwendete Plasmid-DNA wurde durch Qiagen-Anionenaustauschchromatographie wie unter Punkt 3.2.4.2 beschrieben isoliert und gereinigt.

Die Aktivitäten der einzelnen Promotorkonstrukte wurde durch die Expression des Luciferasegens bestimmt. Die einzelnen Promotorfragmente waren in den Reportergenvektor pGL3-Basic (3.2.12) stromaufwärts des Luciferasegens *Photinus pyralis* inseriert. Diesem Reportervektor fehlen Promotor- und Enhancersequenzen, so dass die Expression des Luciferasegens mit der Transkriptionsaktivität der vorgeschalteten Promotorbereiche korrelierte. Um die Effekte der Promotordeletionen auf die Genexpression zu standardisieren, wurde in allen Transfektionsexperimenten ein interner Standard einbezogen, der es erlaubt, experimentell erzeugte Unterschiede in der Transkriptionsaktivität des Promotors von trivialen Effekten (z.B. unterschiedliche Transfektionseffizienzen oder Schwankungen in der Extraktpräparation) zu trennen. Als interner Standard wurde stets der pRL-TK Reportergenvektor (3.2.12) cotransfiziert, dessen Reportergen für eine Luciferase der marinen Pflanze *Renilla reniformis* codiert und unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht. Aufgrund ihres unterschiedlichen evolutionären Ursprungs haben die beiden Luciferasen verschiedene Enzymstrukturen und Substraterfordernisse (3.2.20.4). Diese ermöglichen die individuelle Messung der Aktivitäten in ein und demselben Zellextrakt. Um sogenannte trans-Effekte des Kontrollvektors pRL-TK auf das Promotortestplasmid auszuschließen, wurde der pRL-TK-Vektor im deutlichen Überschuss eingesetzt. Das Verhältnis Promotortestplasmid zu Kontrollvektor war 10:1.

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Promotoraktivitäten wie in dem folgenden Abschnitt 4.6.1 beschrieben bestimmt.

4.6.1 Messung der Reportergenaktivitäten

Zunächst wurde die differentiell regulierte Luciferase-Expression (*Photinus pyralis*) der Promotortestplasmide gemessen und im Anschluss ein Quencher/Substrat-Gemisch zugegeben, welches die Messung der konstitutiv exprimierten zweiten Luciferase (*Renilla reniformis*) in demselben Zellextrakt erlaubte. Die Luciferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* ist ein monomeres 61 kDa Protein, das unter Lichtemission die Oxidation von Luciferyl-CoA in Gegenwart von ATP und Sauerstoff zu Oxyluciferin, AMP und Kohlendioxid katalysiert (3.2.20.4, Abb. 3.6). Die Luciferase der *Renilla reniformis* ist ein monomeres 36 kDa Protein. Die durch diese Luciferase katalysierte Lumineszenz-Reaktion benötigt Coelenterazin und Sauerstoff als Substrat (3.2.20.4, Abb. 3.7). Die Quantifizierung der Lumineszenz beider Reporterenzyme erfolgte mit den Zellextrakten nach der unter 3.2.30.4 beschriebenen Methode unter Verwendung des Dual LuciferaseTM Reporter Testsystems in einem Luminometer.

Luminometer erreichen bei einer bestimmten Lichtintensität eine Signalsättigung. Damit die Messwerte im linearen Bereich des Luminometers lagen, wurde dieser mit einer Luciferase-Verdünnungsreihe in einem Bereich von 10^{-20} bis 10^{-10} mol/l ermittelt. Verwendet wurde die rekombinante, gereinigte Luciferase *Photinus pyralis* (Promega, 1999). Für die Herstellung der Verdünnungen wurde 1 x Zelllysepuffer, dem 1 mg/ml BSA zugesetzt wurde, verwendet. In die Reaktion wurde jeweils 10 μ l der Luciferase-Verdünnung und 100 μ l Luciferase Assay Reagenz eingesetzt und über ein 10 sec Intervall im Luminometer vermessen. Das Luminometer arbeitete über fünf Größenordnungen im Bereich von 10^{-17} mol (1 pg) bis 10^{-12} mol (0,1 μ g) linear (Abb. 4.20).

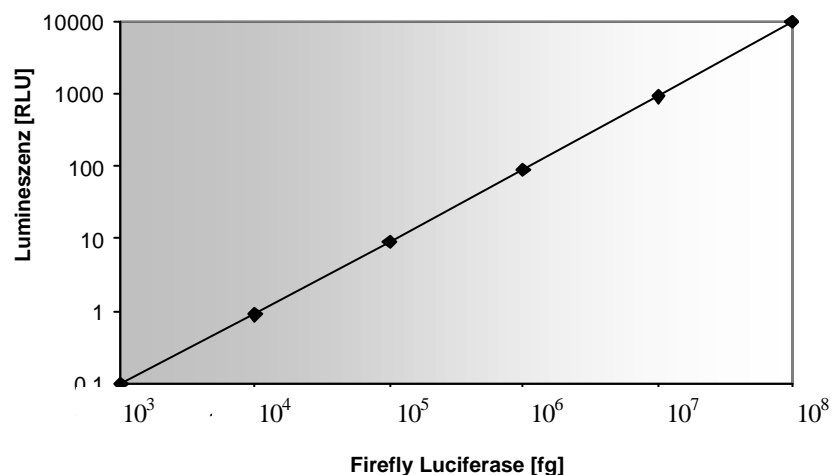


Abb. 4.20: Linearer Bereich der Firefly Luciferase Lumineszenz im BioOrbit 1250 Luminometer

4.6.1.1 Berechnung der relativen Luciferase-Aktivität

Die gemessenen Luciferase-Aktivitäten bei parallelen Ansätzen wurden nach Abzug der Grundaktivität (ohne DNA) jeweils gemittelt. Der auf den cotransfizierten Kontrollvektor (pRL-TK-Aktivität = 100 %) bezogene Luciferase-Umsatz der Promotortestplasmide ergab die Luciferase-Aktivität des jeweiligen Promotortestplasmids. Diese Luciferase-Aktivitäten der Promotortestplasmide wurden auf die Aktivität des Wildtyp-Promotors (pProm 4.350 = 100 %) bezogen und ergaben dadurch den Wert für die relative Luciferase-Aktivität (rel. Luc-Aktivität [%]).

4.6.2 Transiente Transfektion der Fibroblastenzelllinie BHK 21

Zur Identifizierung konstitutiver regulatorischer Elemente, die eine Aktivierung oder Repression des Promotors *tmp* 83.5 bewirken, wurde die Nierenfibroblastenzelllinie BHK 21 verwendet (3.1.13).

Die Transfektion der BHK 21 Zellen mit den Promotortestplasmiden erfolgte nach der unter 3.2.20.1 beschriebenen Methode durch Lipofektion. Die kationischen Liposomen wurden durch Ultraschallbehandlung einer Suspension der kationischen Lipide DDAB (Dimethyldioctadecylammoniumbromid) und α -Phosphatidylcholin (3.2.20.1.1) hergestellt (Felgner et al., 1987). Die DNA wird nicht in die Liposomen eingeschlossen, sondern ionisch an die Oberfläche der Liposomen gebunden. Das optimale Konzentrationsverhältnis von DDAB-Liposomen zu DNA zur kompletten Komplexierung der DNA lag bei 2 [$\mu\text{l}/\mu\text{g}$ DNA] (Teifel und Friedl, 1995). Zunächst wurde mit der Lipidmischung DDAB/ α -Phosphatidylcholin die Abhängigkeit der Transfektion von der Plasmidkonzentration untersucht. Hierzu wurden 3×10^4 BHK 21 Zellen in 24-Loch-Platten ausgesät und nach 24 h mit 0,5 – 5 μg Plasmid-DNA transfiziert. Eingesetzt wurde der pRL-TK Kontrollvektor im Verhältnis 1:10. Das Optimum lag bei 4 μg Plasmid-DNA. Bei höheren DNA-Konzentrationen sank die Effizienz wieder (siehe Abb. 4.21). Dieser Effekt ist möglicherweise auf eine Absättigung der Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche zurückzuführen, welche die positiv geladenen DNA-Liposomen-Komplexe binden. Der Rückgang der Transfektionseffizienz bei höheren Liposomenbeladung ist wahrscheinlich durch die Cytotoxizität der eingesetzten Liposomen zu erklären.

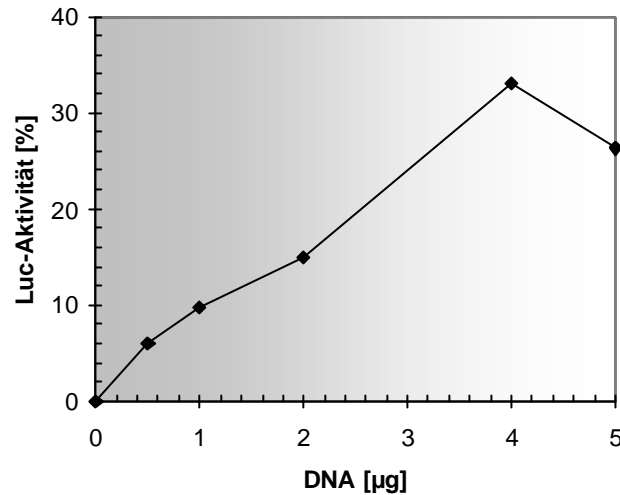


Abb. 4.21: Lipofektion von BHK 21 mit Azolectin/DDAB-Liposomen in Abhängigkeit von der Konzentration der Plasmid-DNA.

Die BHK 21 Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit einer Aussaatdichte von 3×10^4 Zellen pro Kavität einer 24-Loch-Platte ausgesät und kultiviert (3.2.19.5). Die Liposomen wurden am Tag der Transfektion wie unter Punkt 3.2.20.1.1 beschrieben hergestellt. Zur Bildung der Liposomen-DNA-Komplexe wurden insgesamt 4 µg Plasmid-DNA, im Verhältnis 10:1 Promotortestplasmid zu Kontrollvektor pRL-TK, und 8 µl Liposomenlösung 30 min bei RT inkubiert. Für jedes einzelne Testplasmid wurden 8 Transfektionsansätze parallel angesetzt. Als Kontrollen wurden jeweils zwei Reaktionsansätze ohne DNA und Liposomen, nur mit Liposomen und nur mit DNA (nichtkomplexierte DNA) inkubiert. Der Transfektionsmix wurde 5 h auf den Zellen belassen, dann frisches Kulturmedium aufgegeben und die Zellen weitere 43 h kultiviert. Nach 48stündiger Expression wurden die Zellen mit 100 µl 1 x PL-Puffer pro Kavität aufgeschlossen (3.2.20.3). Die Bestimmung der Reporterogenaktivitäten erfolgte mit dem Dual LuciferaseTM Testsystem (3.2.20.4) und die relativen Luciferase-Aktivitäten wurden wie unter Punkt 4.6.1.1 beschrieben berechnet. Die Promotoraktivitäten der einzelnen Testplasmide sind in Abbildung 4.22 und 4.23 dargestellt. Die relative Luciferase-Aktivität des Wildtyps pProm 4.350 wurde 100 % gesetzt.

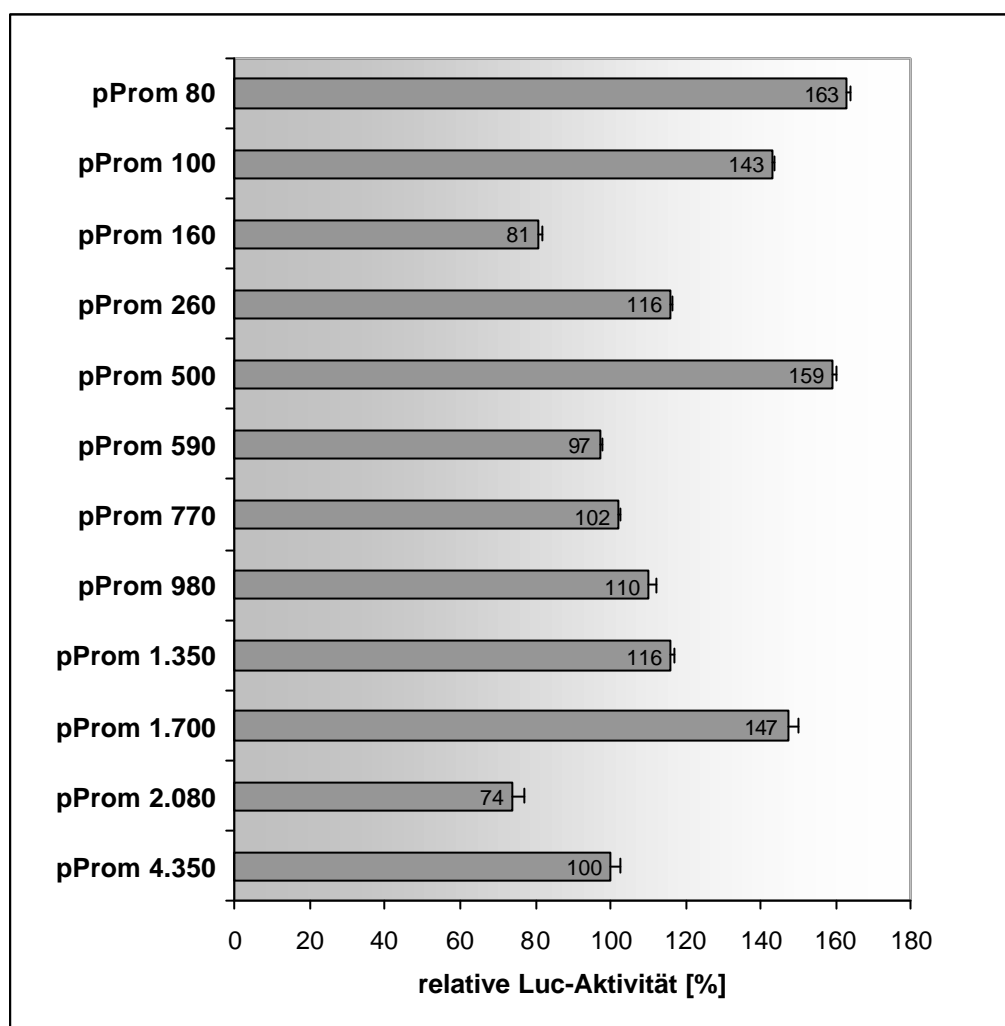


Abb. 4.22: Aktivitäten des Wildtyp-Promotors pProm 4.350 und der zunehmend 5'-verkürzten Promotortestplasmide pProm 2.080 bis pProm 80 in der Zelllinie BHK 21

Die prozentuale Änderung der relativen Luciferase-Aktivität der einzelnen Promotortestplasmide gegenüber der vorherigen Deletion sowie dem Wildtyp-Promotor und dem basalen Promotor (pProm 80) sind in der Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Signifikante Aktivitätsänderungen ergaben sich zwischen den Sequenzbereichen der Promotortestplasmide pProm 2.080 und pProm 1.700, pProm 590 und pProm 500 sowie pProm 160 und pProm 100.

Tab. 4.5: Prozentuale Änderungen und Vergleich der rel. Luc-Aktivitäten der Promotortestplasmide gegenüber der vorherigen Deletion sowie zum Wildtyp-Promotor und pProm 80 in der Zelllinie BHK 21. Die prozentuale Erhöhung der rel. Luc-Aktivität ist mit (+) und die Erniedrigung mit (-) gekennzeichnet.

Promotor- testplasmid	Änderung der rel. Luc- Aktivität [%] gegenüber der vorherigen Deletion	Vergleich der rel. Luc- Aktivität [%] zum	
		Wildtyp	pProm 80
pProm 4.350			39 (-)
pProm 2.080	26 (-)	26 (-)	55 (-)
pProm 1.700	98 (+)	47 (+)	10 (-)
pProm 1.350	21 (-)	16 (+)	29 (-)
pProm 980	5 (-)	10 (+)	33 (-)
pProm 770	7 (-)	2 (+)	37 (-)
pProm 590	5 (-)	3 (-)	40 (-)
pProm 500	64 (+)	59 (+)	3 (-)
pProm 260	27 (-)	16 (+)	29 (-)
pProm 160	30 (-)	19 (-)	50 (-)
pProm 100	77 (+)	43 (+)	12 (-)
pProm 80	14 (+)	63 (+)	

Die Transkriptionsaktivität der Promotortestplasmide pProm 4.350/UTR und pProm 100/UTR, die zusätzlich die 5'-nichttranslatierte Region enthalten, wurden mit den Aktivitäten der Promotortestplasmide pProm 4.350 und pProm 100 verglichen. Dies sollte zeigen, ob in der Region vom Transkriptionsstartpunkt bis zum Startpunkt der Translation regulatorische Elemente enthalten sind. Hier wurde die Aktivität des pProm 4.350/UTR 100 % gesetzt. Die Promotoraktivitäten der Testplasmide sind in Abbildung 4.23 dargestellt.

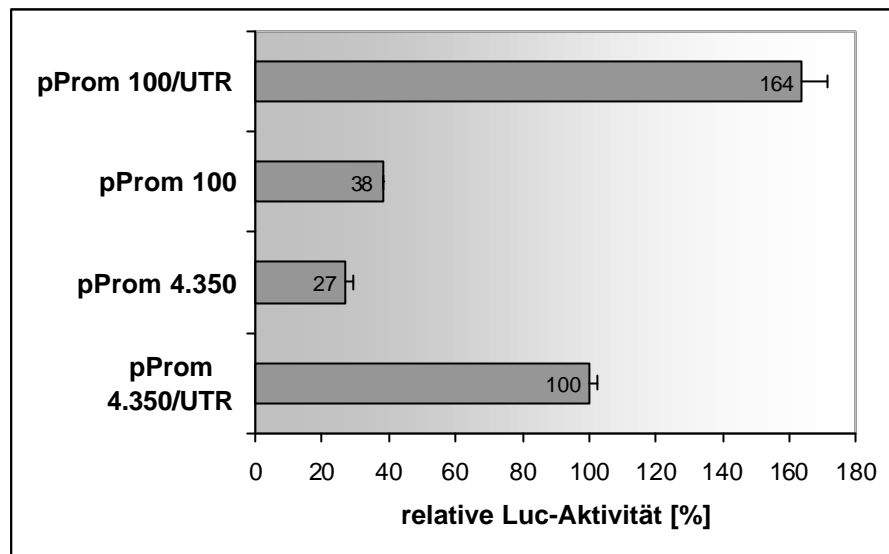


Abb. 4.23: Aktivitäten der Promotortestplasmide pProm 4.350/UTR und pProm 100/UTR mit 5'-nichttranslatierter Region in der Zelllinie BHK 21

Durch die 5'-UTR wurde die relative Luciferase-Aktivität des Wildtyps um 73 % erhöht. Die Aktivität des Promotors pProm 100 erhöhte sich um 332 %. Demnach enthält die 5'-nichttranslatierte-Region ein wesentliches funktionelles Element zur Steigerung der Promotoraktivität des Gens 83.5.

Die Bedeutung der Deletionsstudien wird in der Diskussion im Kontext mit den Ergebnissen der transfizierten neuronalen Zelllinien erläutert.

4.6.3 Transiente Transfektion der humanen Neuroblastomazelllinie SK-N-SH

Zur Transfektion der Zelllinie SK-N-SH (3.1.13) wurde das kommerziell erhältliche Transfektions-Reagenz FuGENETM 6 verwendet. Im Vergleich zu den Transfektions-Reagenzien SuperFect und LipofectAMINE wurden bei diesem Reagenz höhere Transfektionsraten erzielt und keine Cytotoxizität beobachtet. In Vorversuchen wurde zunächst das optimale Verhältnis FuGENETM 6 zu DNA getestet.

Das optimale Verhältnis lag bei 3:1 Transfektionsreagenz zu DNA, bei einer Gesamtmenge an DNA von 3 µg. 24 h vor der Transfektion wurden pro Kavität einer 6-Loch-Platte 3×10^5 Zellen ausgesät und kultiviert (3.2.19.7). Promotortestplasmid und Kontrollvektor pRL-TK wurden im Verhältnis 10 : 1 eingesetzt. Der Transfektions-Mix wurde auf den Zellen belassen und nach 24 h ein Medienwechsel durchgeführt. Insgesamt betrug die Expressionsdauer 48 h. Dann wurden die Zellen wie unter Punkt 3.2.20.3 beschrieben mit 500 µl 1 x PL-Puffer aufgeschlossen, die Reporter-gen-Aktivitäten im Luminometer mit

dem Dual Luciferase Test bestimmt (3.2.20.4) und die relativen Aktivitäten berechnet. Für jedes Promotortestplasmid wurden 6 Transfektionsansätze parallel angesetzt. Hinzu kamen jeweils zwei Kontrollansätze nichtkomplexierte DNA, Transfektionsreagenz ohne DNA sowie ohne DNA und Transfektionsreagenz. Die relative Luciferase-Aktivität des Wildtyps pProm 4.350 wurde 100 % gesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.24 und 4.25 dargestellt.

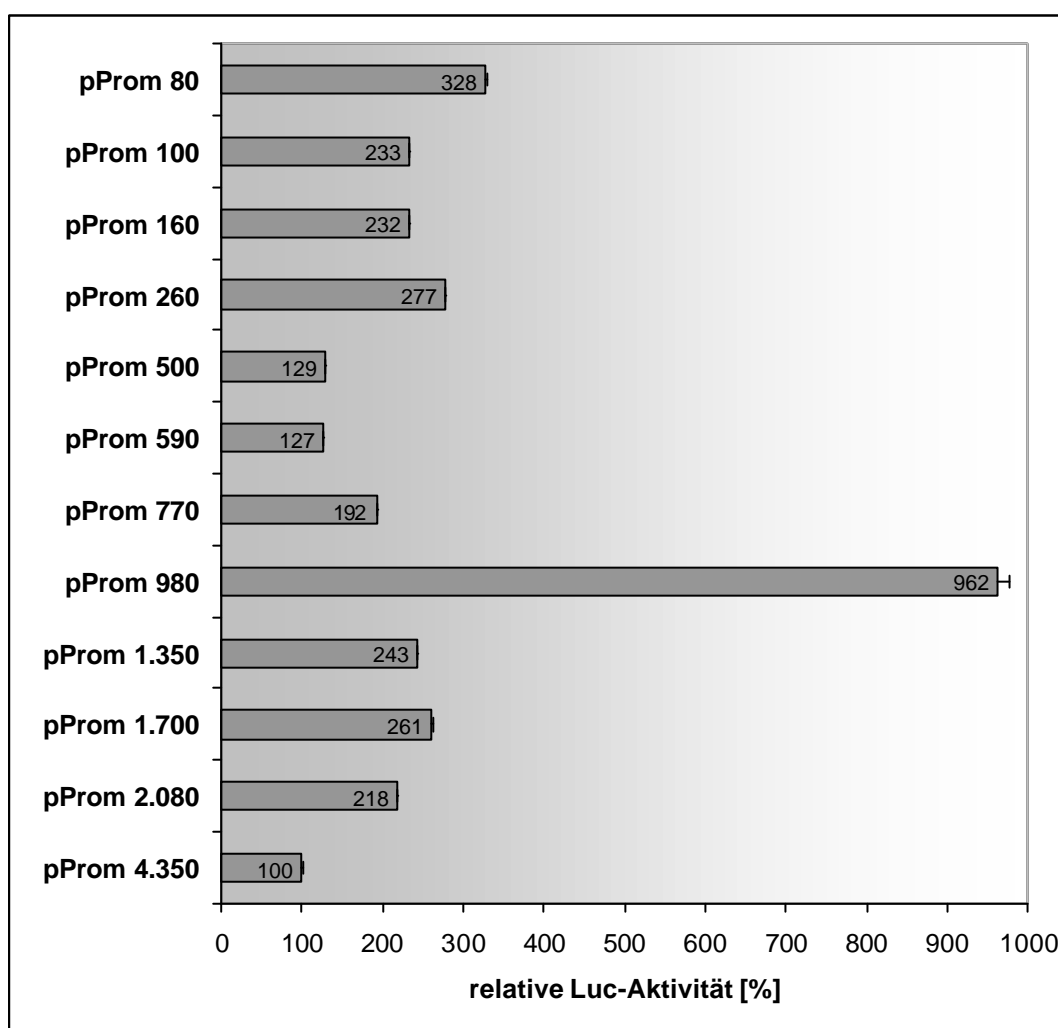


Abb. 4.24: Aktivitäten des Wildtyp-Promotors pProm 4.350 und der zunehmend 5'-verkürzten Promotortestplasmide pProm 2.080 bis pProm 80 in der humanen Zelllinie SK-N-SH

Die prozentuale Änderung der relativen Luciferase-Aktivität der einzelnen Promotortestplasmide gegenüber der vorherigen Deletion sowie dem Wildtyp-Promotor und dem basalen Promotor (pProm 80) sind in der Tabelle 4.6 zusammengefasst.

Signifikante Aktivitätsänderungen ergaben sich zwischen den Sequenzbereichen der Promotortestplasmide pProm 4.350 und pProm 2.080, pProm 1.350 und pProm 980, pProm 980 und pProm 770 und pProm 500 und pProm 260.

Tab. 4.6: Prozentuale Änderungen und Vergleich der rel. Luc-Aktivitäten der Promotortestplasmide gegenüber der vorherigen Deletion und zum Wildtyp-Promotor sowie pProm 80 in der Zelllinie SK-N-SH. Die prozentuale Erhöhung der rel. Luc-Aktivität ist mit (+) und die Erniedrigung mit (-) gekennzeichnet.

Promotor- testplasmid	Änderung der rel. Luc-Aktivität [%] gegenüber der vorherigen Deletion	Vergleich der rel. Luc- Aktivität [%] zum	
		Wildtyp	pProm 80
pProm 4.350			70 (-)
pProm 2.080	118 (+)	118 (+)	34 (-)
pProm 1.700	20 (+)	161 (+)	20 (-)
pProm 1.350	8 (-)	143 (+)	26 (-)
pProm 980	296 (+)	862 (+)	193 (+)
pProm 770	80 (-)	92 (+)	42 (-)
pProm 590	34 (-)	27 (+)	61 (-)
pProm 500	2 (+)	29 (+)	61 (-)
pProm 260	115 (+)	177 (+)	16 (-)
pProm 160	16 (-)	132 (+)	29 (-)
pProm 100	0,4 (+)	133 (+)	29 (-)
pProm 80	41 (+)	228 (+)	

Die Transkriptionsaktivität der Promotortestplasmide pProm 4.350/UTR und pProm 100/UTR tragen zusätzlich zur Promotorregion die 5'-nichttranslatierte Region. Deren Transkriptionsaktivität sollte im Vergleich zu den Aktivitäten der Promotortestplasmide pProm 4.350 und pProm 100 zeigen, ob in der Region vom Transkriptionsstartpunkt bis zum Startpunkt der Translation funktionelle Elemente enthalten sind (Abb. 4.25). Hier wurde die Aktivität des pProm 4.350/UTR 100 % gesetzt.

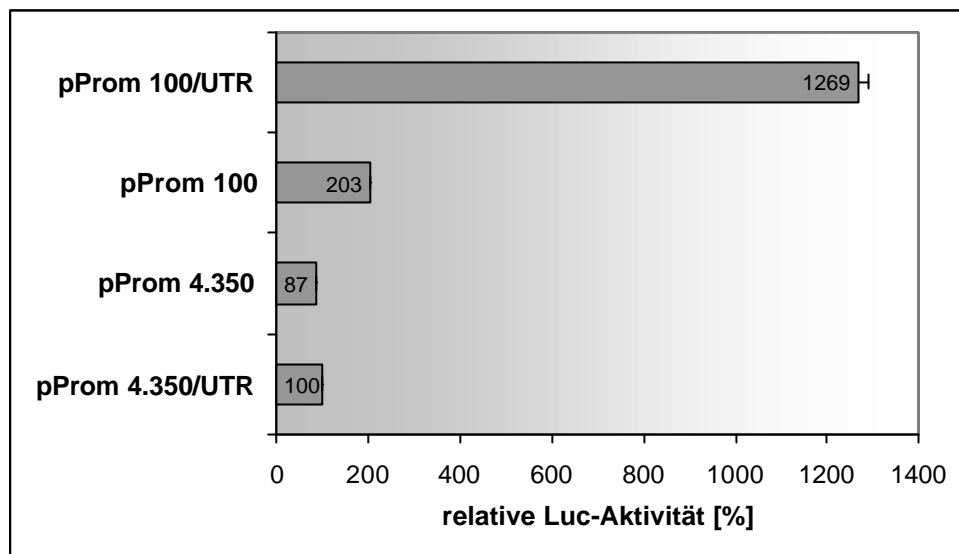


Abb. 4.25: Aktivitäten der Promotortestplasmide pProm 4.350/UTR und pProm 100/UTR mit 5'-nichttranslatierter Region in der Zelllinie SK-N-SH

Durch das Anfügen der 5'-nichttranslatierten Region an den basalen Promotor pProm 100 wurde die Aktivität um 525 % erhöht. Wohingegen die 5'-UTR des Wildtyps keinen signifikanten Effekt auf die Expression zeigte. Die 5'-UTR-Region enthielt demnach ein wesentliches Element zur Steigerung der Promotoraktivität des Gens 83.5, dessen Wirkung im Wildtyp-Promotor jedoch unter den gegebenen Bedingungen gering ist.

Die Bedeutung der Deletionsstudien wird in der Diskussion im Kontext mit den Ergebnissen aller Zelllinien erläutert.

4.6.4 Transiente Transfektion der murinen Neuroblastomazelllinie Neuro-2a

Die Zelllinie Neuro-2a (3.1.13) wurde wie für die SK-N-SH Zellen beschrieben (4.6.3) unter denselben Reaktionsbedingungen mit dem Transfektions-Reagenz FuGENETM 6 transfiziert. Das optimale Verhältnis Transfektionsreagenz zu DNA lag ebenfalls bei 3:1, bei einer Gesamtmenge DNA von 3 µg. 24 h vor der Transfektion wurden pro Kavität einer 6-Loch-Platte 3×10^5 Zellen ausplattiert und kultiviert (3.2.19.7). Promotortestplasmid und Kontrollvektor pRL-TK wurden im Verhältnis 10:1 eingesetzt und insgesamt 48 h unter Kulturbedingungen exprimiert. Für jedes Promotortestplasmid wurden 6 Transfektionsansätze parallel angesetzt. Hinzu kamen jeweils zwei Kontrollansätze nichtkomplexierte DNA, Transfektionsreagenz ohne DNA und ohne

Zugabe von DNA und Transfektionsreagenz. Die Promotoraktivitäten der einzelnen Testplasmide sind in den Abbildung 4.26 und 4.27 dargestellt.

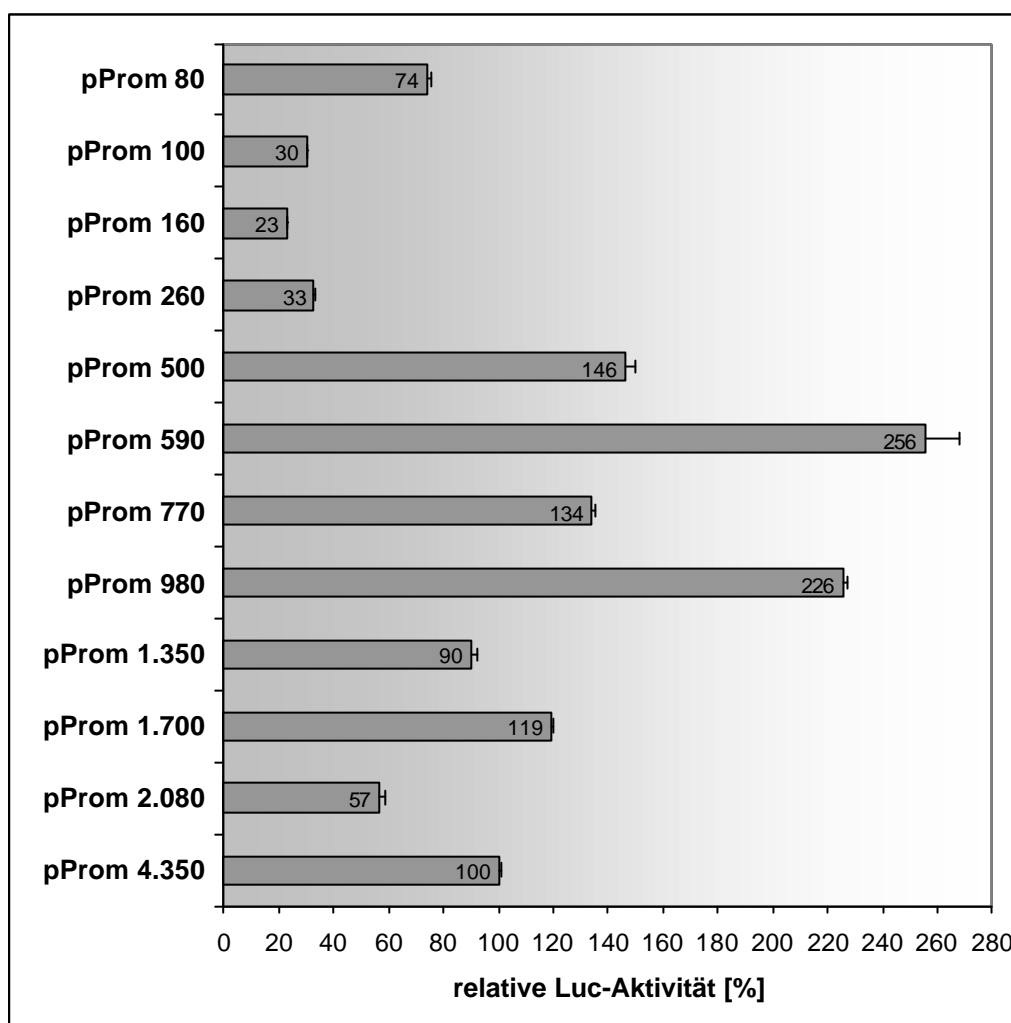


Abb. 4.26: Aktivitäten des Wildtyp-Promotors pProm 4.350 und der zunehmend 5'-verkürzten Promotortestplasmide pProm 2.080 bis pProm 80 in der murinen Zelllinie Neuro-2a

Die prozentuale Änderung der relativen Luciferase-Aktivität der einzelnen Promotortestplasmide gegenüber der vorherigen Deletion sowie dem Wildtyp-Promotor und dem basalen Promotor (pProm 80) sind in der Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Signifikante Aktivitätsänderungen ergaben sich zwischen den Sequenzbereichen der Promotortestplasmide pProm 2.080 und pProm 1.700, pProm 1.350 und pProm 980, pProm 980 und pProm 770, pProm 770 und pProm 590, pProm 590 und pProm 500, pProm 500 und pProm 260 sowie pProm 100 und pProm 80.

Tab. 4.7: Prozentuale Änderungen und Vergleich der rel. Luc-Aktivitäten der Promotortestplasmide gegenüber der vorherigen Deletion und zum Wildtyp-Promotor sowie pProm 80 in der Zelllinie Neuro-2a. Die prozentuale Erhöhung der rel. Luc-Aktivität ist mit (+) und die Erniedrigung mit (-) gekennzeichnet.

Promotor- testplasmid	Änderung der rel. Luc-Aktivität [%] gegenüber der vorherigen Deletion	Vergleich der rel. Luc- Aktivität [%] zum	
		Wildtyp	pProm 80
pProm 4.350			35 (+)
pProm 2.080	43 (-)	43 (-)	23 (-)
pProm 1.700	109 (+)	19 (+)	61 (+)
pProm 1.350	24 (-)	10 (-)	22 (+)
pProm 980	151 (+)	126 (+)	205 (+)
pProm 770	41 (-)	34 (+)	81 (+)
pProm 590	91 (+)	156 (+)	246 (+)
pProm 500	43 (-)	46 (+)	97 (+)
pProm 260	77 (-)	67 (-)	55 (-)
pProm 160	30 (-)	77 (-)	69 (-)
pProm 100	30 (+)	70 (-)	59 (-)
pProm 80	147 (+)	26 (-)	

Die Promotortestplasmide pProm 4.350/UTR und pProm 100/UTR wurden mit den Promotorkonstrukten pProm 4.350 und pProm 100 ohne 5'-UTR verglichen (Abbildung 4.27).

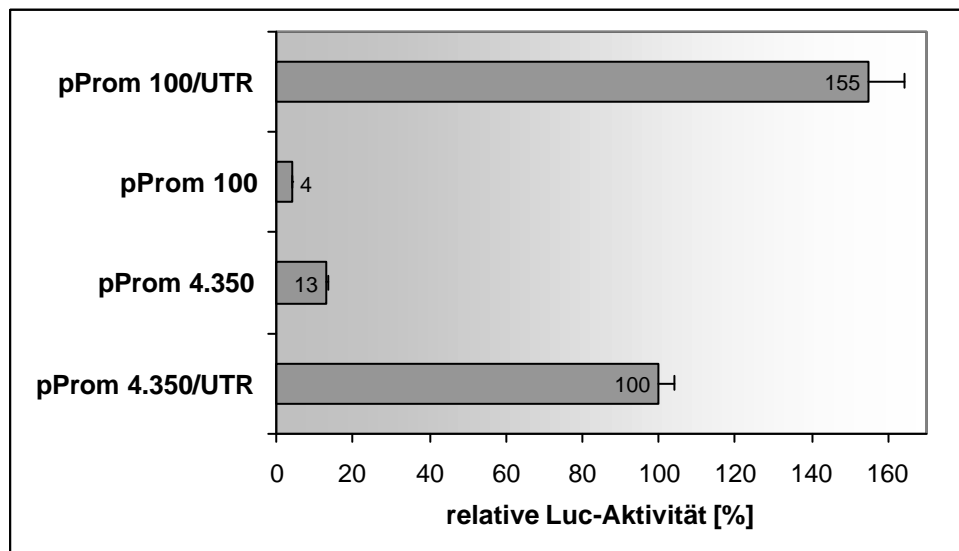


Abb. 4.27: Aktivitäten der Promotortestplasmide pProm 4.350/UTR und pProm 100/UTR mit 5'-nichttranslatierter Region in der Zelllinie Neuro-2a

In der Neuro-2a Zelllinie konnte eine deutliche Erhöhung der Expression mit der 5'-UTR beobachtet werden. Der Aktivitätswert von pProm 100 zu pProm 100/UTR erhöhte sich um 3775 % und von pProm 4.350 zu pProm 4.350/UTR um 87 %. In der 5'-nichttranslatierten Region liegt dementsprechend ein funktionelles Transkriptionselement, das die Transkriptionsrate des Promotors *tmp* 83.5 signifikant erhöht.

Die Bedeutung der Deletionsstudien wird in der Diskussion im Kontext mit den Ergebnissen aller Zelllinien erläutert.

4.6.5 Transiente Transfektion der Phäochromocytom-Zelllinie PC-12 aus Ratte

PC-12 Zellen (3.1.13) sind aufgrund ihrer geringen Größe (5-10 µm), ihrem geringen Cytoplasmagehalt und ihrer langen Verdopplungszeit (> 2 d) relativ schwer zu transfizieren (Kelly-Spratt, 1998). Nach ihrer Differenzierung zu sympathischen Neuronen durch Behandlung mit dem Nerve Growth Faktor (NGF) sinkt die Transfektionseffizienz weiter. Vor der Transfektion der Promotortestplasmide in die differenzierten PC-12 Zellen wurde deshalb die Transfektionseffizienz mit verschiedenen Reagenzien bestimmt. Eingesetzt wurden die Transfektionsreagenzien Lipofectamine, Lipofectamine Plus, DDAB/Lecithin und SuperFect. Die Transfektion mit DDAB-Liposomen erfolgte wie für die BHK 21 Zellen beschrieben (3.2.20.1). Unter Verwendung der Transfektionsreagenzien Lipofectamine und Lipofectamine Plus wurde die Transfektion nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Transfektion mit SuperFect erfolgte nach einer Vorschrift von Kelly-Spratt (Qiagen, 1998, Punkt 3.2.20.2.2). Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde der Reportervektor pCMVβ (3.2.12) transfiziert, der das β-Galactosidasegen enthält. Nach einer Expressionsdauer von 48 h wurde die β-Galactosidase durch X-gal-Färbung nachgewiesen (3.2.20.2.3). Hierbei wurden die Zellen mit Glutaraldehyd im Kulturgefäß fixiert und mit einer Substratlösung inkubiert. Als Substrat diente 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-gal). Nach Hydrolyse des X-gal entsteht ein Indolderivat, das die Zellen als blauer Niederschlag färbt. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen β-Galactosidase-positiver (blauer) Zellen im mikroskopischen Bild. Dieser Test besitzt den Vorteil, dass auch sehr niedrige Expressionsraten bzw. einzelne Zellen mit einer β-Galactosidase-Expression erfasst werden können. Die Transfektionseffizienz wurde als relativer Anteil positiver Zellen zur Gesamtzahl ausgesäter Zellen berechnet. Die Transfektionseffizienz betrug bei Verwendung des SuperFect-Reagenz 1 %, bei LipofectAMINE und LipofectAMINE Plus lediglich 0,2 % und mit DDAB-Liposomen 0,1%.

Aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienzen befand sich die Transkriptionsaktivität der Promotortestplasmide und des Kontrollvektors pRL-TK an der unteren Messgrenze des Luminometers. Diese Zelllinie wurde daher nicht zu weiteren Untersuchungen eingesetzt.

4.7 DNase I Footprinting Analyse des Promotors *tmp* 83.5 von Position –260 bis +24

Die Analyse des Promotors *tmp* 83.5 mittels Promotortestplasmiden in transfizierten Zelllinien führte bei der Verkürzung bis auf Position –234 (pProm 260) noch zu einer basalen Aktivität der Transkription (Abschnitt 4.6). Potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wurden in diesem Sequenzbereich zunächst über die Methode des DNase I Footprintings identifiziert, die eine Bestimmung von Protein-Bindungsstellen innerhalb eines DNA-Bereiches von 100 bis 300 bp erlaubt.

In den DNase I Footprinting Analysen wurde der Kern- und proximale Promotor *tmp* 83.5 von insgesamt 281 bp untersucht. Die Footprint-Analyse wurde an zwei DNA-Fragmenten durchgeführt, die sich zum einen von Position -138 bis +24 und zum anderen von Position -252 bis –71 erstrecken.

4.7.1 Prinzip des DNase I Footprintings

Zur Bestimmung von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren auf einem Promotorabschnitt bieten sich primär DNase I Footprinting Analysen an. Diese von Galas und Schmitz 1978 entwickelte Methode erlaubt die basengenaue Lokalisation von sequenzspezifischen Proteinbindestellen innerhalb eines relativ langen DNA-Fragmentes von 100 bis 300 bp. Der Name rührt daher, dass durch die Bindung eines Transkriptionsfaktors an einen DNA-Sequenzabschnitt dieser vor der Hydrolyse durch die Endonuklease DNase I geschützt wird. Trennt man die Hydrolyseprodukte einer solchen Reaktion nach ihrer Größe auf, so fehlen in dem geschützten Bereich mehrere Banden. Dies ist der charakteristische „Footprint“ des Transkriptionsfaktors, der an diesen DNA-Abschnitt mit hoher Affinität bindet.

Für das DNase I Footprinting wird ein doppelsträngiges DNA-Fragment auf nur einer Seite und an nur einem Strang radioaktiv markiert. Dieses markierte DNA-Fragment wird in einer Bindereaktion mit Proteinextrakten aus den Zellkernen inkubiert, welche die Transkriptionsfaktoren beinhalten. Anschließend folgt eine Hydrolysereaktion mit der Desoxyribonuklease I, bei der die Bedingungen so gewählt werden, dass jeder DNA-Strang statistisch nur einmal gespalten wird. Die erhaltenen Hydrolyseprodukte werden

parallel mit einer Sequenzierreaktion als Größenstandard auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel nach ihrer Größe aufgetrennt. Außerdem wird eine Hydrolyse des DNA-Fragmentes mit aufgetragen, bei der zuvor keine Inkubation mit Kernextrakten erfolgte. Durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren hervorgerufene Unterschiede im Bandenmuster können dann genau lokalisiert und der entsprechenden Sequenz zugeordnet werden. Das Prinzip des DNase I Footprinting ist in Abbildung 4.28 schematisch dargestellt.

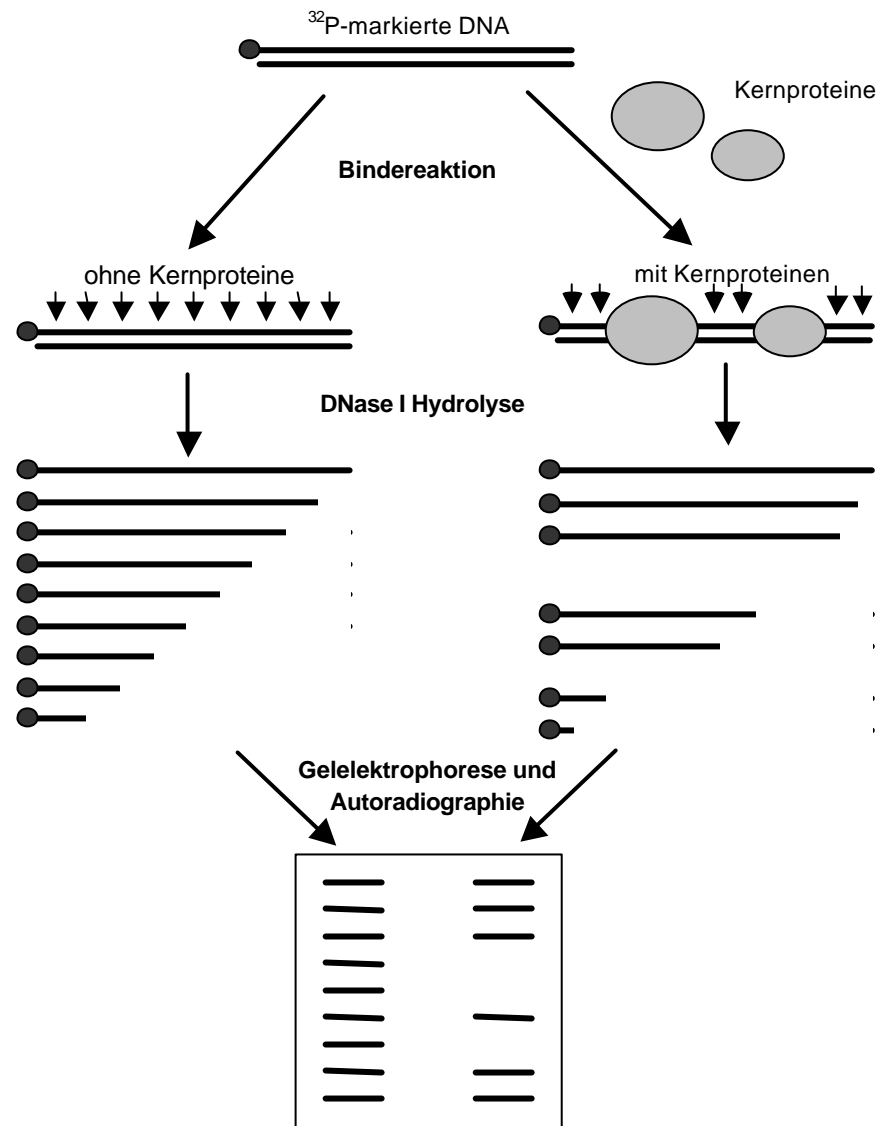


Abb. 4.28: Die Methode des DNase I Footprinting

Die Bindung von Proteinen an DNA schützt diese vor dem Angriff des Enzyms DNase I, deshalb entsteht an der Bindestelle eine Lücke in der DNA-Leiter, der sogenannte Footprint.

4.7.2 DNase I Footprinting Analyse der Promotorregion –138 bis +24

Zur Durchführung der Footprinting Analyse des Promotorbereichs –138 bis +24 wurde sowohl der codierende als auch der nichtcodierende DNA-Strang untersucht. Dies setzte jeweils eine einseitige radioaktive Markierung des zu untersuchenden DNA-Stranges voraus.

Erhalten wurde der Promotorbereich durch Restriktion des Promotortestplasmids pProm 160 (siehe 4.5.1.3.1, Abbildung 4.19).

4.7.2.1 Präparation des codierenden Stranges

Zur spezifischen radioaktiven Markierung des codierenden Stranges wurden 30 µg des pProm 160 mit je 40 U der Restriktionsendonukleasen Kpn I und Hind III hydrolysiert (3.2.8.1). Die Restriktion wurde in einem 1 %igen „Large DNA Low Melt“ Agarosegel aufgetrennt und das entstandene 218 bp lange DNA-Fragment mit β-Agarase aus dem Gel eluiert (Punkt 3.2.6.1). Das eluierte DNA-Fragment wurde nach der Reinigung nochmals in einem 1,5 %igen Agarosegel überprüft (3.2.12.1).

Die radioaktive Markierung des codierenden Stranges erfolgte dann durch Auffüllen des durch die Hind III Hydrolyse entstandenen 5'-Überhangs mit dem Klenow-Fragment (3.2.7.2). Somit wurde der DNA-Strang am 3'-Ende markiert. Zur Entfernung der freien Nukleotide wurde die DNA-Lösung über das QIAquick Nucleotid Removal Kit gereinigt (3.2.5.4) und bis zur Footprinting Analyse bei –20 °C aufbewahrt.

4.7.2.2 Präparation des nichtcodierenden Stranges

Zur spezifischen Markierung des nichtcodierenden Stranges wurde das wie oben beschrieben geleluierte 218 bp DNA-Fragment zunächst mit Alkalischer Phosphatase 5'-dephosphoryliert (3.2.8.2) und an beiden 5'-Enden mit T4 Polynukleotidkinase radioaktiv markiert (3.2.7.1). Die freien Nukleotide wurden über das QIAquick Nucleotid Removal Kit entfernt (3.2.5.4) und die DNA mit 20 U Nhe I hydrolysiert. Durch die Hydrolyse mit Nhe I wurde die 5'-Markierung des codierenden Stranges entfernt und das DNA-Fragment war anschließend am 5'-Ende des nichtcodierenden Stranges markiert. Der Restriktionsansatz wurde über das QIAquick PCR Purification Kit gereinigt (3.2.5.3).

4.7.3 DNase I Footprinting Analyse des codierenden und nicht-codierenden Stranges des Promotorbereichs –138 bis +24

Zunächst wurde für die DNase I Footprint Analyse eine gängige Standardmethode (Meulia und Diggelmann, 1990; Zhang et al., 1995; Daniel und Kim, 1996) angewandt.

Zu Beginn der DNase I Footprinting Experimente konnten keine eindeutigen DNA Leitern und Footprints erhalten werden, so dass zunächst die kritischen Parameter wie Pufferzusammensetzung, Enzymkonzentrationen, Menge an radioaktiv markierter DNA und die Protein/DNA-Inkubationsbedingungen optimiert werden mussten.

Neben einem HEPES-Puffer mit physiologischem pH-Wert (pH 7,6) enthielt der Bindungspuffer die zweiwertigen Kationen Mg^{2+} und Zn^{2+} (Ausubel et al., 1988). So werden beispielsweise für die Ausbildung von nativen DNA-Protein-Wechselwirkungen bei den sogenannten Zink-Finger-Proteinen Zn^{2+} -Ionen benötigt.

Des weiteren wurde nach der Bindungsreaktion ein Puffer hinzugegeben, der die bivalenten Metallionen Ca^{2+} und Mg^{2+} enthielt. Diese sind notwendige Cofaktoren der DNase I.

Ein bekanntes Problem stellt jedoch die in Kernproteinpräparationen enthaltenen hohen Nukleaseaktivitäten dar. Bei einer Inkubation der DNA-Fragmente mit Kernproteinfraktionen bei Raumtemperatur erfolgte in Vorversuchen schnell eine Degradation der markierten DNA-Moleküle. Aus diesem Grund wurde die DNase I Menge auf 20 ng reduziert und die Inkubationszeit auf 20 bis 30 s verkürzt.

In der Praxis ist nach einer Bindungsreaktion zwischen markiertem DNA-Fragment und Kernproteinen häufig ein großer Anteil der markierten DNA ungebunden und es entsteht so ein zu großer Hintergrund im Footprinting-Gel auch in den Bereichen der Bindungssequenzen (Revzin, 1993). Unter diesen Bedingungen kann ein Footprint nicht mehr deutlich erkannt werden. Der Anteil an Protein-gebundener DNA kann beispielsweise bei den in dieser Arbeit durchgeführten Band-Shift-Analysen (4.8) demonstriert werden, bei denen in der Regel ein großer Teil der markierten DNA als freie DNA und nicht im Komplex mit Proteinen vorlag. Aus diesem Grund wurde bei Bindungsreaktionen für Footprint Analysen 150 bis 250 μ g Kernproteinen in den Versuch eingesetzt. Bei den Bandshift-Experimenten (3.2.17.2) wurden jeweils nur 3 μ g Kernprotein in die Bindungsreaktion eingesetzt.

Die Kernproteine wurden sowohl aus differenzierten PC-12 Zellen (3.2.16.1) als auch aus Gehirngewebe (3.2.16.2) isoliert und in die Footprint-Analyse eingesetzt.

Pro DNA-Fragment wurden ca. 90.000 cpm in die Bindereaktion eingesetzt. Nach der Zugabe der radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurde der Ansatz für 40 min auf Eis

inkubiert. Vor der anschließenden DNase I Hydrolyse wurden 50 µl des MgCl₂/CaCl₂-Puffers zugegeben, der zuvor auf RT temperiert wurde. Die DNase I-Stammlösung (3.2.18) wurde auf eine Konzentration von 4 ng/µl eingestellt und pro Reaktion wurden 20 ng DNase I eingesetzt. Nach 30sekündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 100 µl Stopp-Puffer und einer Inkubation von 1 h bei 37 °C beendet. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 20 µg Proteinase K und Inkubation für 1 h bei 37 °C deaktiviert und hydrolysiert. Die Reaktionsansätze wurden im SpeedVac Konzentrator auf ein Endvolumen von 50 µl eingeeengt und zur Entfernung der Proteinreste und Salze über das QIAquick Nucleotid Removal Kit (3.2.5.4) gereinigt. Die gereinigten Proben wurden dann im SpeedVac Konzentrator bis zur Trockene zentrifugiert, zur Entfernung von Salzresten zweimal mit je 400 µl 80 %igen Ethanol gewaschen und die fragmentierte DNA erneut getrocknet. Das DNA-Sediment wurde in 3 µl Wasser und 3 µl Auftragspuffer aufgenommen. Nach 3minütiger Hitzedenaturierung der Proben wurden sie auf Eis überführt und mindestens 2.000 cpm der Proben in einem 6 %igem Polyacrylamid-Harnstoff-Gel (3.2.12.2) gelelektrophoretisch getrennt und autoradiographiert. Parallel zu den DNase I Footprinting Ansätzen wurde eine Sequenzierreaktion aufgetragen, die eine Zuordnung der DNase I Fragmente zur Promotorsequenz ermöglichte. Die Ergebnisse der Footprint Analysen sind in Abbildung 4.29 und 4.30 dargestellt.

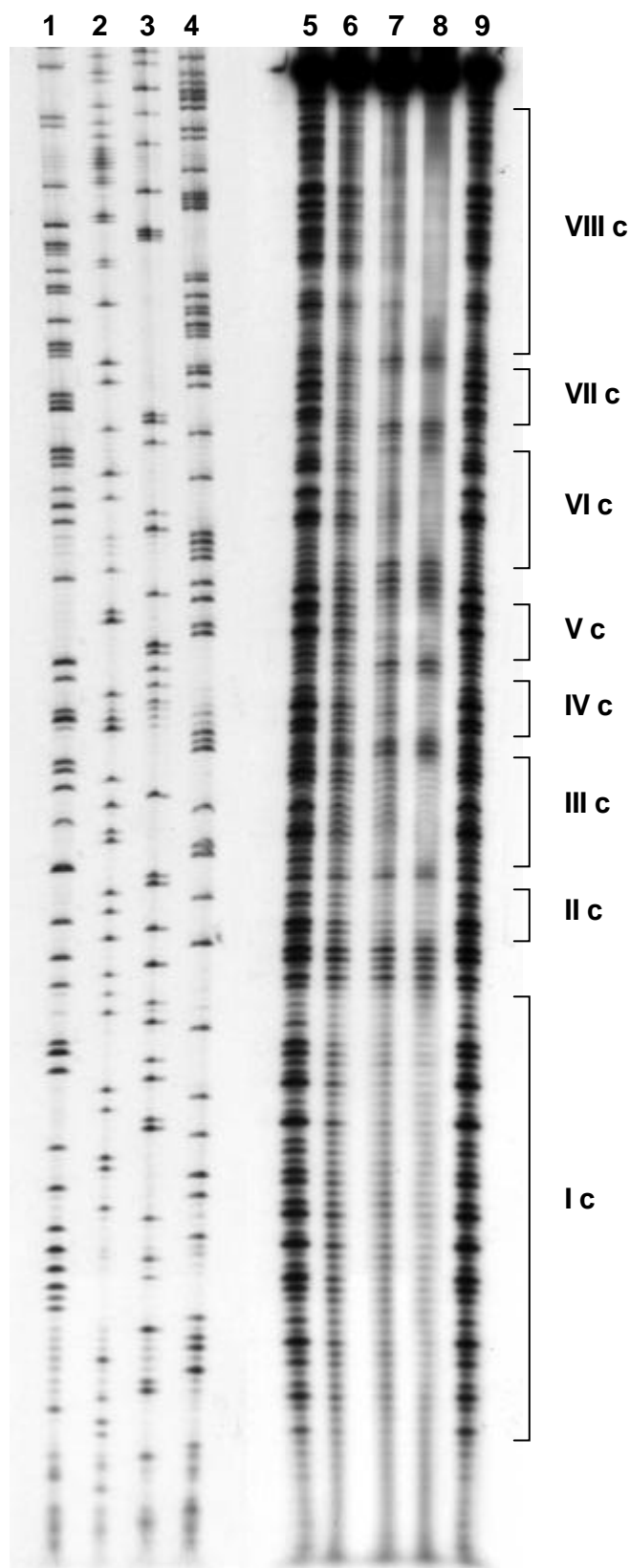


Abb. 4.29: DNase I Footprinting Analyse des codierenden Stranges des Promotorbereichs -138 bis +24

In den Spuren 1 bis 4 sind die Sequenzierungsreaktionen des pProm 4.350 mit dem RV3-Primer in der Reihenfolge A, C, G, T aufgetragen. In den Spuren 5 bis 9 sind jeweils 2.000 cpm der DNase I Footprinting Reaktionen aufgetragen. Spur 5 und 9: DNA-Hydrolyse ohne Kernproteine; Spur 6: DNA-Hydrolyse mit 50 µg Kernproteinen; Spur 7: DNA-Hydrolyse mit 150 µg Kernproteinen; Spur 8: DNA-Hydrolyse mit 250 µg Kernproteinen. Durch Proteinbindungen geschützte Regionen wurden in der Abbildung gekennzeichnet und mit römischen Ziffern von Position +24 nach -139 nummeriert, die den Suffix c für codierend haben.

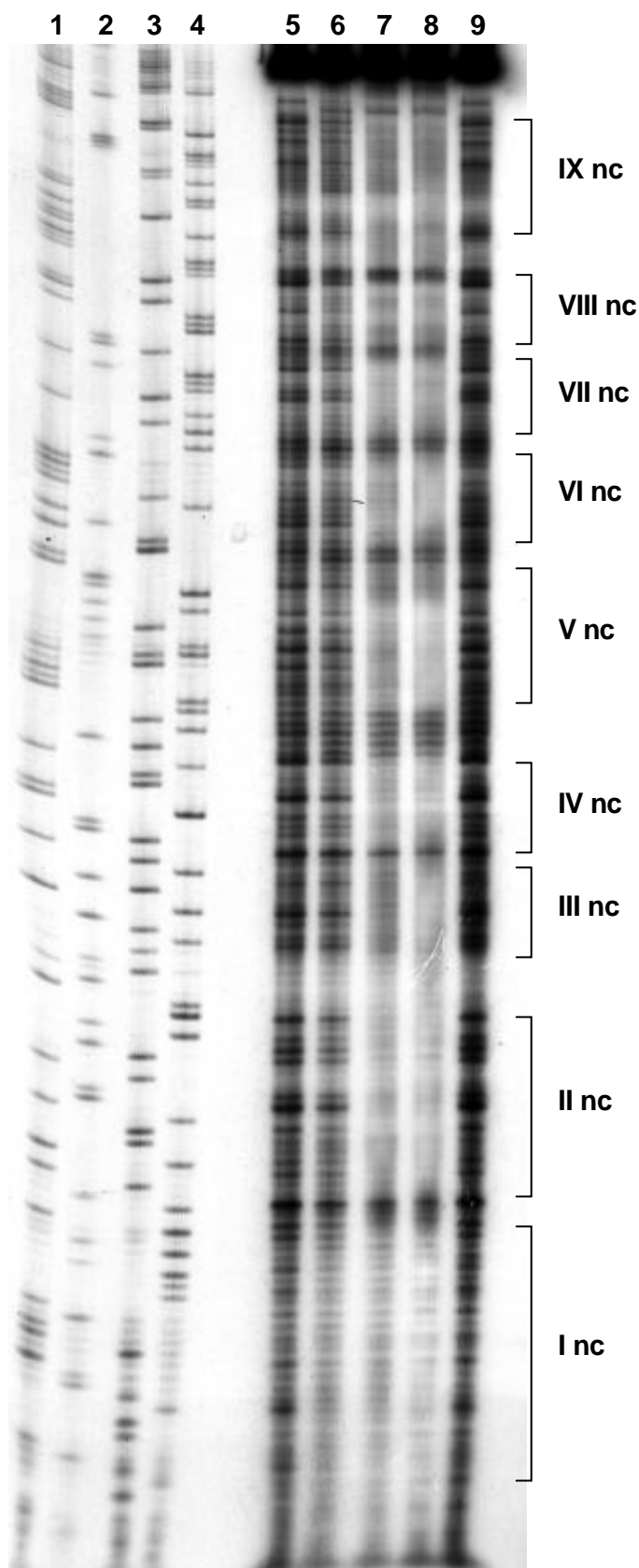


Abb. 4.30: DNase I Footprint Analyse des nichtcodierenden Stranges des Promotorbereichs –138 bis +24. In den Spuren 1 bis 4 sind die Sequenzierungsreaktionen des pProm 4.350 mit dem RV3-Primer in der Reihenfolge A, C, G, T aufgetragen. In den Spuren 5 bis 9 sind jeweils 2.000 cpm der DNase I Footprinting Reaktionen aufgetragen. Spur 5 und 9: DNA-Hydrolyse ohne Kernproteine; Spur 6: DNA-Hydrolyse mit 50 µg Kernproteinen; Spur 7: DNA-Hydrolyse mit 150 µg Kernproteinen; Spur 8: DNA-Hydrolyse mit 250 µg Kernproteinen. Durch Proteinbindungen geschützte Regionen wurden in der Abbildung gekennzeichnet und mit römischen Ziffern von Position +24 nach –139 nummeriert, die den Suffix nc für nichtcodierend haben.

Es konnten im codierenden acht und im nichtcodierenden Strang neun Regionen identifiziert werden (Abb. 4.29 und 4.30), in denen im Vergleich zur Referenzspur ohne Kernproteinbindung eine DNase I Protektion beobachtet werden konnte. Die Zuordnung der ermittelten Proteinbindungsstellen zur Sequenz des untersuchten Promotorbereichs ist in Abbildung 4.31 dargestellt.

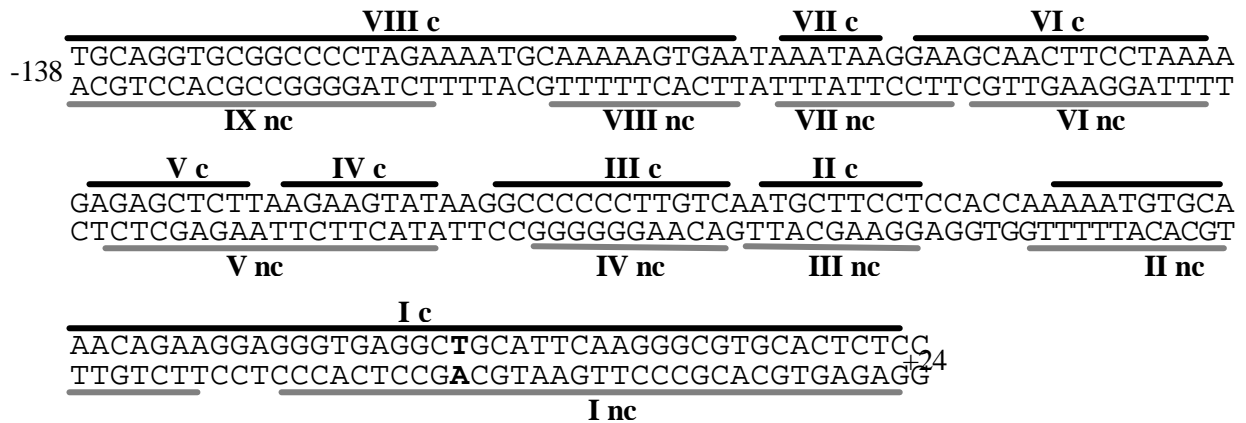


Abb. 4.31: Korrelation der geschützten Regionen zu der Promotorsequenz -138 bis +24

Die ermittelten Proteinbindungsstellen des codierenden Stranges sind durch schwarze Balken an der Sequenz gekennzeichnet und mit römischen Ziffern nummeriert, die den Suffix c für codierend erhielten. Die Proteinbindungsstellen des nichtcodierenden DNA-Stranges sind durch graue Balken gekennzeichnet und römischen Ziffern nummeriert, die den Suffix nc für nichtcodierend erhielten.

4.7.4 DNase I Footprinting Analyse der Promotorregion -252 bis -71

Zur Durchführung der Footprinting Analyse des Promotorbereichs -252 bis -71 wurde sowohl der codierende als auch der nichtcodierende DNA-Strang untersucht. Dies setzte jeweils eine einseitige radioaktive Markierung des zu untersuchenden DNA-Stranges voraus.

Der Promotorbereich wurde durch die PCR unter Einsatz der Pwo-DNA Polymerase amplifiziert (3.2.9), wobei durch die Verwendung eines ^{32}P -markierten Oligonukleotids ein einseitig markiertes DNA-Fragment für die Footprint-Analyse hergestellt wurde. Mit dem Oligonukleotid SP2 (3.1.14.2) wurde der codierende DNA-Strang und mit dem Oligonukleotid T3 (3.1.14.2) der nichtcodierende Strang radioaktiv markiert. Als DNA-Matrize wurde ein Subklon des Gens 83.5 mit der Bezeichnung pSG4a (Bangsow, 1996) eingesetzt.

Zur radioaktiven Markierung des Oligonukleotidprimers wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μl 10 pmol des Oligonukleotids mit 10 U T4 Polynukleotidkinase und 60 μCi γ - ^{32}P -ATP für 30 min bei 37 °C inkubiert (3.2.7.1), anschließend wurde nochmals 10 U T4 Polynukleotidkinase zugegeben und für 30 min bei angegebener Temperatur inkubiert. Der Markierungsansatz wurde über das QIAquick Nucleotid Removal Kit (3.2.5.4) gereinigt

und 20 µl in die PCR eingesetzt. Der PCR-Ansatz und das PCR Profil sind in Tabelle 4.8 angegeben. Die PCR Produkte wurden anschließend in einem 1,5 %igen Agarosegel (3.2.12.1) analysiert (Abb. 4.32) und über das QIAquick PCR Purification Kit (3.2.5.3) gereinigt.

Tab. 4.8: PCR-Ansatz und-Profil zur Amplifikation des Promotorbereichs –252 bis –71

PCR-Ansatz		PCR-Temperatur-Zeit-Profil
Mix A: V=50µl	20 mM dNTP Mix 2 pmol SP2 25 pmol T3 20 ng pSG4a ad H ₂ O _{bidest.}	1 x Denaturierung Mix A: 94 °C; 5 min
Mix B: V=50µl	10 µl 10 x PCR Puffer 250 mM MgSO ₄ 2,5 U Pwo DNA Polymerase ad H ₂ O _{bidest.}	Zugabe von Mix B: 30 x Denaturierung: 94 °C; 15 s Annealing: 56 °C; 30 s Extension: 72 °C; 2 min 1 x Final Extension: 72 °C; 10 min

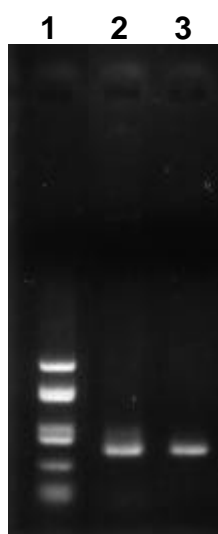


Abb. 4.32: Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Ansätze

Jeweils 10 µl der PCR-Ansätze wurden in einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt. Spur 1: Größenstandard pUC18/Hae III; Spur 2: PCR-Ansatz pSG4a amplifiziert mit den Oligonukleotidprimern SP2 und T3, SP2 war 5'-phosphoryliert; Spur 3: wie Spur 2, Oligonukleotidprimer T3 war 5'-phosphoryliert.

Zur Untersuchung des Promotorfragmentes auf Proteinbindestellen wurden DNase I Footprinting Analysen des codierenden und nichtcodierenden Stranges durchgeführt (3.2.18). Pro DNA-Fragment wurden ca. 90.000 cpm in die Bindereaktion eingesetzt. Nach der Zugabe der radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Vor der anschließenden DNase I Hydrolyse wurden 50 µl des MgCl₂/CaCl₂-Puffers zugegeben, der zuvor auf RT temperiert wurde. Die DNase I-Stammlösung

(3.2.18) wurde auf eine Konzentration von 4 ng/ μ l eingestellt, pro Reaktion wurden 20 ng DNase I eingesetzt. Nach 30sekündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 100 μ l Stopp-Puffer und einer Inkubation von 1 h bei 37 °C beendet. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 20 μ g Proteinase K und Inkubation für 1 h bei 37 °C deaktiviert und abgebaut. Die Reaktionsansätze wurden im SpeedVac Konzentrator auf ein Endvolumen von 50 μ l eingengt und zur Entfernung der Proteinreste und Salze über das QIAquick Nucleotid Removal Kit (3.2.5.4) gereinigt. Die gereinigten Proben wurden dann im SpeedVac Konzentrator bis zur Trockene eingengt, zur Entfernung von Salzresten zweimal mit je 400 μ l 80 %igen Ethanol gewaschen und die fragmentierte DNA erneut getrocknet. Das DNA-Sediment wurde in 3 μ l Wasser und 3 μ l Auftragspuffer aufgenommen. Nach 3minütiger Hitzedenaturierung der Proben wurden sie auf Eis überführt und mindestens 2.000 cpm der Proben in einem 6 %igem Polyacrylamid-Harnstoff-Gel (3.2.12.2) gelelektrophoretisch getrennt und autoradiographiert. Parallel zu den DNase I Footprinting Ansätzen wurde eine Sequenzierreaktion aufgetragen, die die Zuordnung der DNase I Fragmente zur Promotorsequenz ermöglichte. Das Ergebnis der Footprint Analyse ist in Abbildung 4.33 dargestellt.

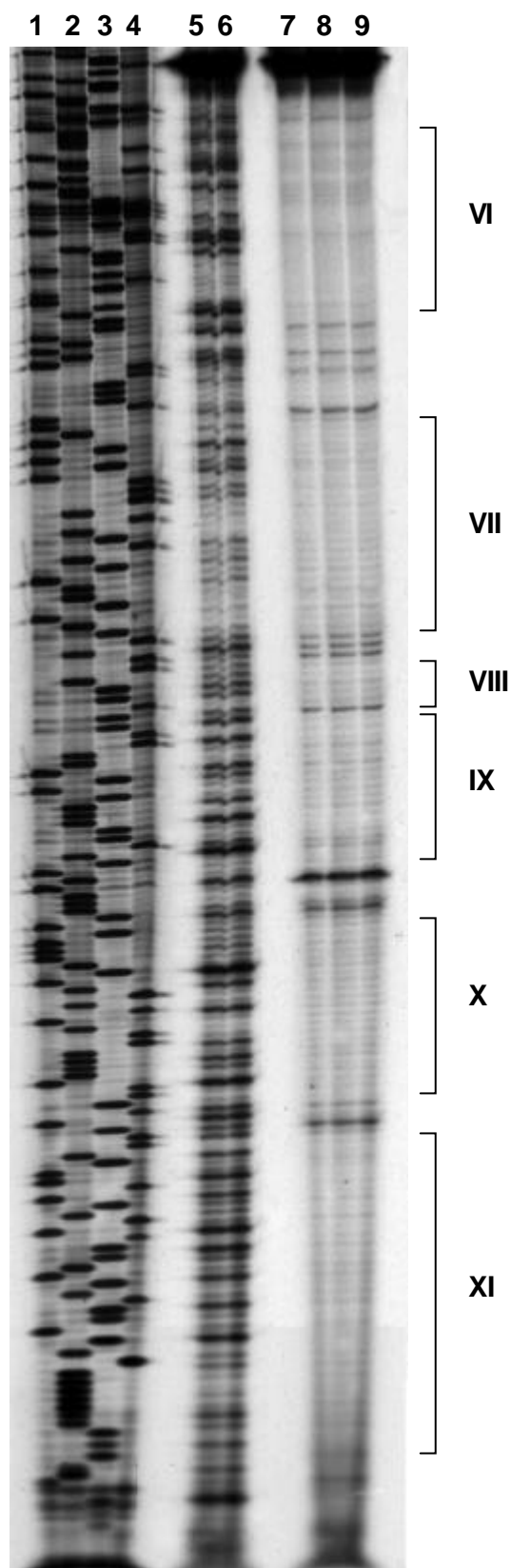


Abb. 4.33: DNase I Footprinting Analyse des codierenden Stranges des Promotorbereichs -252 bis -71

Der Kernproteinextrakt wurde aus Gehirn des Schweins isoliert. Es wurden 250 µg Kernproteine zur Bindung an die DNA eingesetzt. In den Spuren 1 bis 4 ist die Sanger-Sequenzierungsreaktionen des pSG4b mit dem T7-Primer in der Reihenfolge A, C, G, T zur Identifizierung der Nukleotidpositionen aufgetragen. In den Spuren 5 bis 9 sind jeweils 2.000 cpm der DNase I Footprinting Reaktionen aufgetragen. Spur 5 und 6: DNA-Hydrolyse ohne Kernproteinen; Spur 7 bis 9: DNA-Hydrolyse mit 250 µg Kernproteinen. Durch Proteinbindungen geschützte Regionen wurden in der Abbildung gekennzeichnet und mit römischen Ziffern nummeriert.

Es konnten sechs Regionen im codierenden Strang identifiziert werden, in denen im Vergleich zur Referenzspur ohne Kernproteinbindung DNase I Protektionen beobachtet wurden (siehe Abb. 4.33). Die ermittelten Bindestellen sind in Abbildung 4.34 in der Sequenz des Promotorbereichs dargestellt. Die Proteinbindungen VI, VII, VIII und 6 nt der Proteinbindung IX bestätigen die geschützten Bereiche der Promotorregion -138 bis +24 (IX nc, VIII nc, VII nc (bzw. VIII c und VII c) sowie Teilsequenzen von VI nc, VI c und V nc, V c, Abb. 4.29). Die Analyse des nichtcodierenden Stranges der Promotorregion -252 bis -71 zeigte keine eindeutigen DNase I Protektionen, so dass diese nicht zur Auswertung herangezogen wurde.

```

-257 AACCCGACTAGGAACCATGAGGTTGTCAGTTCGATCCCTGGCCTCGCTTTCCTGTGGCTG
                                     XI

TGGTGTAGGCCAGGGGCTACAGCTCCAATTGGACCCCTAGCCTGGGAACCTCCATACGCT
IX

GCAGGTGCGGCCCTAGAAAATGCAAAAAGTGAATAAATAAGGAAGCAACTTCCTAAAAGA
VIII      VII      VI

GAGCTCT -71

```

Abb. 4.34: Korrelation der geschützten Regionen zu dem codierenden Strang der Promotorsequenz -252 bis -71.

4.7.5 Korrelation der DNase I Footprinting Bindestellen zu bekannten Bindestellen für Transkriptionsfaktoren

Die Promotorsequenz von Position -260 bis +24 wurde mit dem Programm MatInspector professional 5.1 der TRANSFAC-Datenbank (Wingender et al., 1996 und Quandt et al., 1995) nach Sequenzhomologien der erhaltenen Footprints zu bekannten Transkriptionsfaktor-Bindestellen untersucht. Die Zuordnung der Footprints zu den Proteinbindestellen ist in Abbildung 4.35 für die Promotorregion -257 bis -70 und in Abbildung 4.36 für die Promotorregion -138 bis +24 dargestellt.

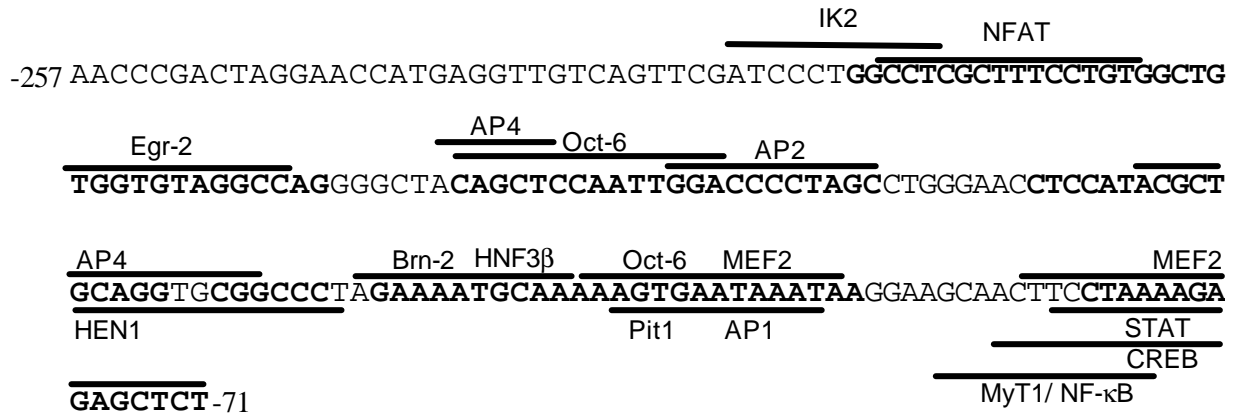


Abb. 4.35: Korrelation bekannter Transkriptionsfaktor-Bindestellen zu den durch DNase I Footprinting ermittelten Proteinbindestellen. Die experimentell ermittelten Transkriptionsfaktor-Bindestellen sind in der Sequenz fett unterlegt und die Bezeichnung der Transkriptionsfaktoren angegeben.

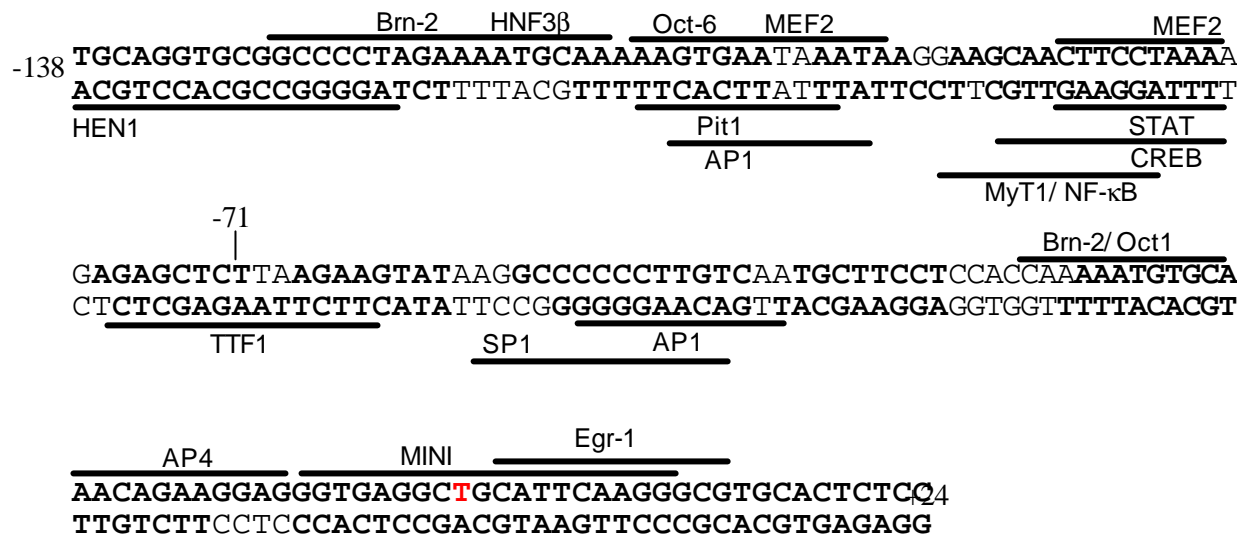


Abb. 4.36: Korrelation bekannter Transkriptionsfaktor-Bindestellen zu den durch DNase I Footprinting ermittelten Proteinbindestellen. Die experimentell ermittelten Transkriptionsfaktor-Bindestellen sind in der Sequenz fett unterlegt und die Bezeichnung der Transkriptionsfaktoren angegeben. Der Transkriptionsstartpunkt ist t rot unterlegt.

4.8 Band Shift Analysen

4.8.1 Prinzip der Band Shift Analyse

Die *in vitro* Identifizierung von sequenzspezifischen Proteinbindungsstellen an DNA-Molekülen erfolgte über die Band Shift Analyse, auch Gelretardationsanalyse genannt. Bei diesem Verfahren werden radioaktiv markierte DNA-Fragmente aus dem Promotorbereich mit einem Zellkernproteinextrakt inkubiert. Bei Komplexbildung zwischen der DNA und DNA-bindenden Proteinen wird die gelelektrophoretische Mobilität der DNA-Moleküle verlangsamt. In einer nativen Gelelektrophorese können neben der vorauslaufenden ungebundenen Fraktion von DNA-Molekülen langsamer laufende DNA-Protein-Komplexe als sogenannte Band-Shifts erkannt werden. Der Nachweis von DNA und DNA-Protein-Komplexen nach der Gelelektrophorese erfolgt durch Autoradiographie der mit ^{32}P markierten DNA-Fragmente (Abb. 4.37).

Die Spezifität eines Protein-DNA-Komplexes wird über sogenannte Kompetitionsexperimente nachgewiesen. Hierbei wird der Inkubationslösung zusätzlich zu dem radioaktiv markierten DNA-Fragment zuvor ein Überschuss an nicht markiertem DNA-Fragment (Kompetitor) zugesetzt. Wird als Kompetitor-DNA die selbe DNA-Sequenz zugesetzt, die auch als radioaktiv markierte DNA in den Versuch eingesetzt wird, spricht man von homologer Kompetition. Da die Kompetitor-DNA zuvor im Überschuss eingesetzt wird, bindet sie einen Großteil des entsprechenden sequenzspezifischen DNA-Bindeproteins. Ein spezifisches Signal wird im Band Shift schwächer. Wird hingegen als Kompetitor-DNA eine nicht homologe Sequenz eingesetzt, wird das Protein nicht an die Kompetitor-DNA gebunden (heterologe Kompetition). Im Band Shift ist dann ein spezifisches Signal nicht abgeschwächt und der DNA-Protein-Komplex als sequenzspezifisch identifiziert.

Ein grundsätzliches Problem der Protein-DNA-Komplexanalyse besteht in der Bindung von bestimmten Proteinen an DNA-Fragmente, die unabhängig von der verwendeten DNA-Sequenz erfolgt. Diese sequenzunspezifische Bindung kann durch die Wahl eines sogenannten unspezifischen Kompetitors verhindert werden. Als geeignete unspezifische Kompetitoren bei Band Shift Experimenten erwiesen sich die Polynukleotide Poly (dI-dC), Poly (dA-dT), Poly (dG-dC) oder Heringssperma-DNA.

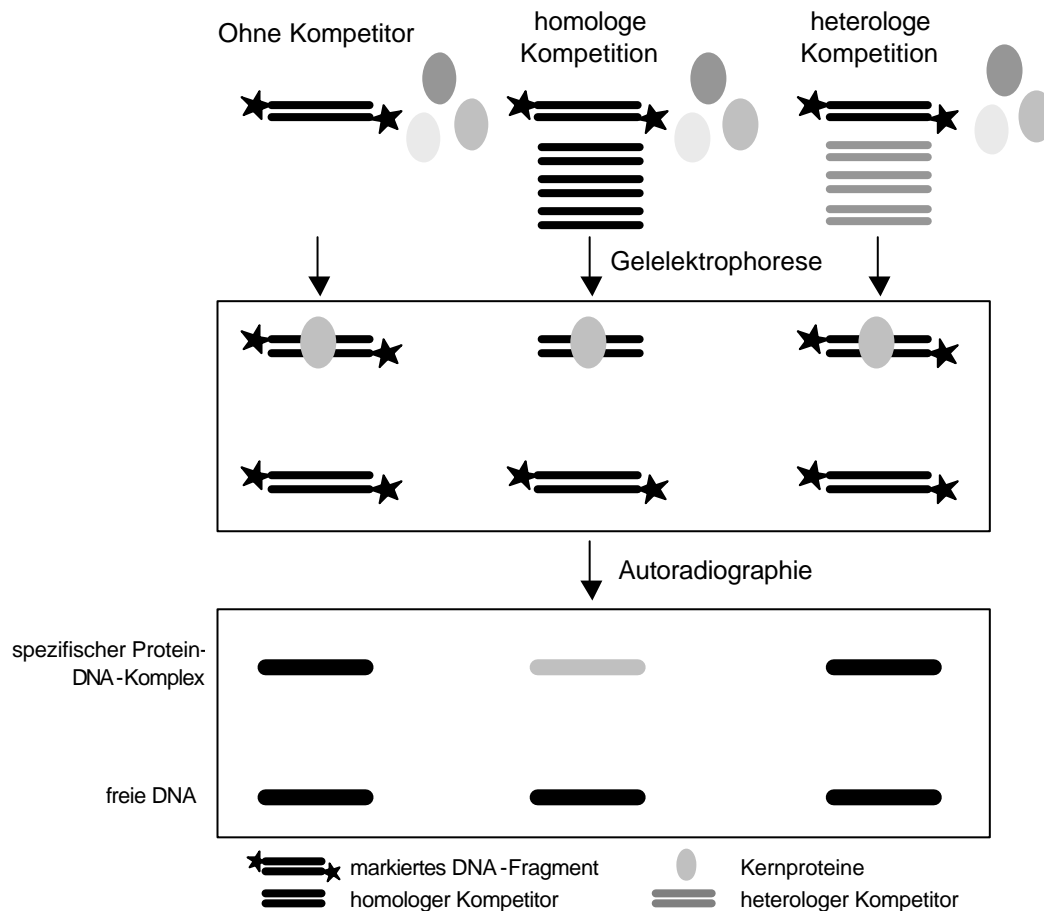


Abb. 4.37: Prinzip der Band Shift Analyse

Der Vergleich der Band Shift Analyse ohne Kompetitor mit den Analysen der homologen und heterologen Konkurrenz zeigen die Sequenzspezifität des Protein-DNA-Komplexes.

Unterschiedliche DNA-bindende Proteine können innerhalb eines doppelsträngigen DNA-Moleküls an beide Stränge oder nur an einen der beiden DNA-Stränge binden. Die Unterscheidung von Einzelstrang- und Doppelstrang-bindenden Proteinen kann in den Band Shift Analysen durch Zugabe eines Überschusses sequenzspezifischer einzelsträngiger DNA gewährleistet werden.

4.8.2 Durchführung der Band Shift Analysen der Promotor-region -258 bis +24

Die experimentelle Vorgehensweise bei der Durchführung der Band Shift Experimente ist unter Punkt 3.2.17 beschrieben.

Die Inkubationsbedingungen für die Protein-DNA-Bindung entsprechen den in der Literatur beschriebenen Standardbedingungen. Neben einem HEPES-Puffer mit physiologischem pH-Wert (pH 7,9) enthielt der Bindungspuffer die zweiwertigen Kationen

Mg²⁺ und Zn²⁺ (Ausubel et al., 1988). So werden beispielsweise für die Ausbildung von nativen DNA-Protein-Wechselwirkungen bei den sogenannten Zink-Finger-Proteinen Zn²⁺-Ionen benötigt (siehe 2.4.1). In die Bindungsreaktionen wurden sowohl Kernproteinextrakte aus den Säugerzellkulturen Neuro-2a und PC-12 (differenziert, 3.2.16.1) als auch aus Gehirngewebe (3.2.16.2) eingesetzt. Die Qualität der Kernproteinextrakte wurde durch eine DAPI-Färbung (3.2.16.4) und eine Band Shift Analyse mit dem DNA-Fragment SP1 (3.1.14.1) überprüft. Dieses DNA-Fragment trägt die Bindestelle für den ubiquitären Transkriptionsfaktor SP1. Intakte Präparationen führen zu drei typischen Band Shift Signalen. Die Band Shift Analyse der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden mehrmals und jeweils mit den Kernproteinextrakten aus den Säugerzellen und dem Gehirngewebe durchgeführt. Damit wurde die Möglichkeit limitiert, dass nicht beobachtete Protein-Bindungen, an den verwendeten Kernproteinextrakten liegen könnten.

Zur Förderung einer Proteindimer-Bildung wurde die Bindungsreaktion nicht nur bei 4° C sondern auch bei RT durchgeführt.

Die elektrophoretische Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe erfolgte schonend in einem nativen 5 %igen Polyacrylamidgel in einem Tris-Glycin-Puffer bei 25 mA und 4 °C (3.2.17.3). Bei höheren Temperaturen und Stromstärken können weniger stabile Protein-DNA-Komplexe während der Gelelektrophorese aufgehoben werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Band-Shift-Analysen konzentrierten sich auf die Region –258 bis +24 des Promotors *tmp* 83.5. Die zuvor mit Hilfe der DNA-Fragmente –257 bis –71 und –138 bis +24 durchgeführten DNase I Footprinting Experimente haben gezeigt, dass in diesen Bereichen Protein-DNA-Wechselwirkungen stattfinden (siehe Abschnitt 4.7).

Die für die nachfolgend beschriebenen *in vitro* Bindungsstudien verwendeten synthetischen DNA-Fragmente und ihre relativen Positionen im Promotor *tmp* 83.5 sind aus der Abbildung 4.38 zu entnehmen. Die Sequenzen der einzelnen Oligonukleotide sind unter Punkt 3.1.14.1 angegeben und die Hybridisierung der Oligonukleotide zu doppelsträngigen markierten Band Shift Sonden ist unter Punkt 3.2.17.1 beschrieben.

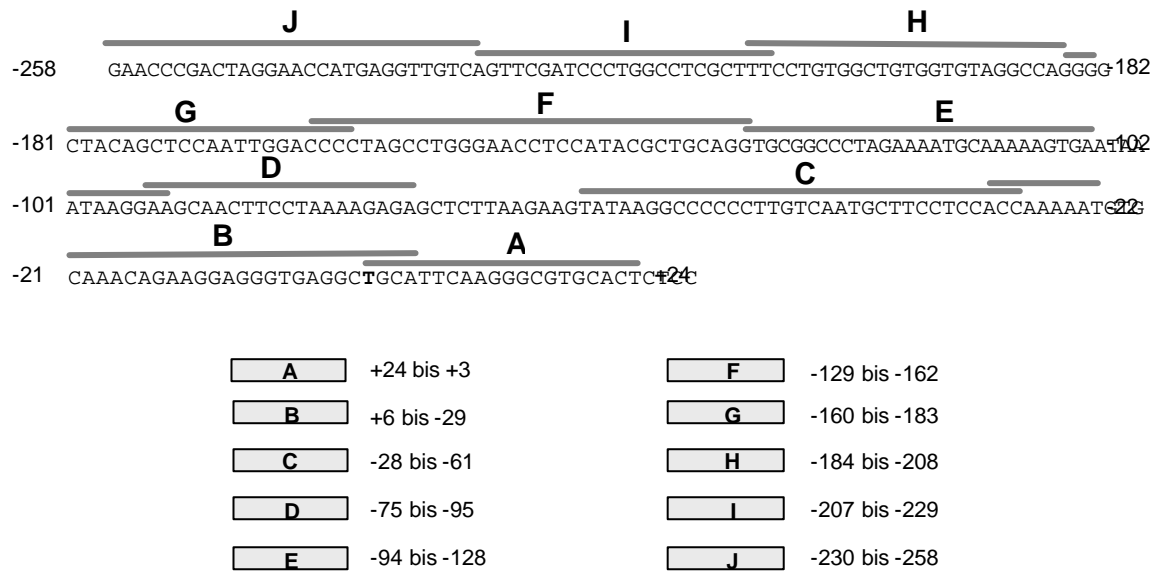


Abb. 4.38: Die Position der in den Band-Shift-Analysen verwendeten synthetischen DNA-Fragmenten innerhalb des Promotors *tmp 83.5*.

Die Spezifität der Protein-DNA-Komplexe wurde durch homologe und heterologe Kompetitionsstudien untersucht (siehe 4.8.1). Zur Bestimmung der Doppelstrang-Spezifität der Proteinbindungen wurde eine homologe Einzelstrang-Kompetition durchgeführt. Zur heterologen Competition wurde jeweils ein Band Shift DNA-Fragment verwendet dessen Sequenz keine Homologie zum markierten Oligonukleotid aufwies. Zur Vermeidung sequenzunspezifischer Bindungen wurde zu jedem Ansatz 1,5 µg unspezifischer Kompetitor Poly (dI-dC) hinzugefügt.

4.8.3 Band Shift Analyse der Promotorregion +3 bis +24

Das für die Band-Shift-Analyse verwendete Oligonukleotid A umfasst die Sequenz der Promotorregion +3 bis +24 (Abb. 4.38). Die DNase I Footprinting Analysen ergaben über den kompletten Bereich sowohl im codierenden als auch nichtcodierenden Strang Protein-DNA-Bindungen (4.7.2.3). Die Band Shift Analyse erfolgte wie unter Punkt 3.2.17 beschrieben. Für die *in vitro* Bindung wurden Kernproteinextrakte aus NGF-induzierten PC-12 Zellen (3.2.19.6) verwendet. In Abbildung 4.39 ist das Ergebnis der Band-Shift-Analyse nach Präinkubation und Inkubation auf Eis dargestellt. Die Band-Shift-Analyse mit dem Oligonukleotid A konnte zeigen, dass sich sechs DNA-Protein-Komplexe innerhalb des untersuchten Promotorabschnittes bilden (Abb. 4.39, Spur 1, bezeichnet als a, b, c, d, e und f).

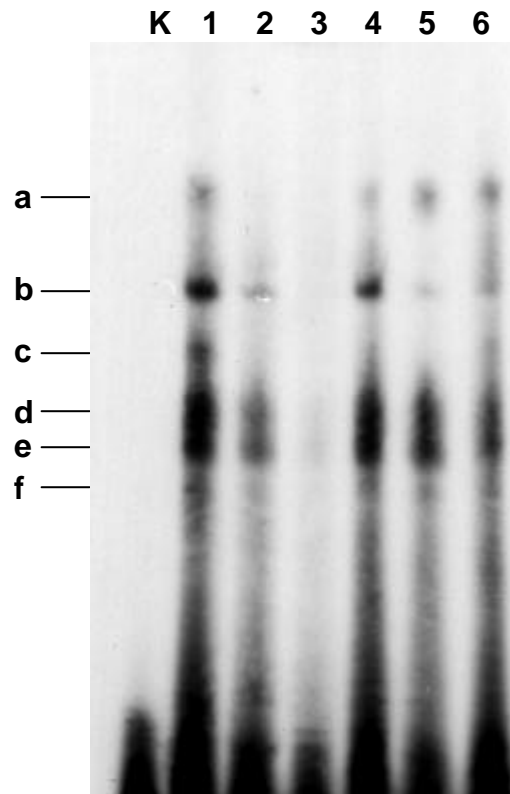


Abb. 4.39: Band-Shift-Analyse der Promotorregion +3 bis +24.

K: Kontrolle (nur DNA); Spur 1: Kernproteine ohne Kompetitor-DNA; Spur 2 und 3: Kernproteine mit Oligonukleotid A als Kompetitor-DNA in 10- und 100-fachem Überschuss; Spur 4 und 5: Kernproteine mit Oligonukleotid E als unspezifischer Kompetitor in 10- und 100fachem Überschuss; Spur 6: Einzelstrang a des Oligonukleotids A als Kompetitor im 100fachen Überschuss.

Zur genaueren Analyse, ob die gefundenen Protein-DNA-Wechselwirkungen sequenzspezifisch sind, wurden anschließend Kompetitionstests wie unter Punkt 4.8.1 beschrieben durchgeführt. Als Kompetitor-DNA wurden die Oligonukleotide A und E verwendet (Abb. 4.39). Oligonukleotid A ist damit homologer Kompetitor und das Oligonukleotid E fungiert als heterologer Kompetitor. Im Fall einer sequenzspezifischen Bindung würde das heterologe Oligonukleotid E das Auftreten der Band-Shifts nicht verhindern. Zusätzlich wurde einzelsträngige Kompetitor-DNA eingesetzt, um einzelstrangspezifische Komplexbildung nachweisen zu können. Als einzelsträngige Kompetitor-DNA wurde der nichtcodierende und codierende Strang eingesetzt, dementsprechend die Oligonukleotide Prolink +1a und Prolink +1b (siehe 3.1.14.1). Hierzu wurde vor Zugabe des radioaktiv markierten Oligonukleotids nicht markiertes Oligonukleotid A in 10- und 100fachem Überschuss in den Bindungsansatz gegeben (3.2.17.2). Bei 30 fmol markiertes Oligonukleotid A entspricht dies 0,3 und 3,0 pmol nicht markiertes Oligonukleotid A.

In Abbildung 4.39 ist deutlich zu erkennen, dass eine signifikante Kompetition bei den Komplexen a, b, d, e, und f nur in Gegenwart homologer Kompetitor-DNA eintrat (Spur 2-5). Schon bei 10fachem Überschuss des nicht markierten Oligonukleotid A wurden die

Band-Shifts nahezu vollständig unterbunden. Bei 100fachem Überschuss verschwanden sie vollständig. Im Gegensatz dazu wurden die Band-Shifts von der heterologen Kompetitor-DNA kaum beeinflusst (Abb. 4.39, Spur 4 und 5). Lediglich bei einem 100fachen Überschuss des Oligonukleotids E konnte eine leichte Abschwächung des Shifts a und b beobachtet werden. Der Band Shift c wurde schon bei 10fachem Überschuss an heterologem Kompetitor entfernt. Dieser Komplex beruht demnach auf einer unspezifischen Protein-DNA Wechselwirkung.

Die einzelsträngige Kompetitor-DNA hatte keinen Einfluss auf die spezifischen Band Shifts (Abb. 4.39, Spur 6). Somit konnten die Komplexe als sequenz- und doppelstrangspezifisch charakterisiert werden.

Zur Analyse, ob die hervorgerufenen Protein-DNA-Komplexe durch Proteindimere hervorgerufen werden, wurde die Komplexbildung auch bei RT durchgeführt. Hierzu wurden die Ansätze ohne DNA-Fragment zunächst 10 min bei RT präinkubiert und nach Zugabe der markierten DNA 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als homologer und heterologer Kompetitor wurde das Oligonukleotid A und das Oligonukleotid E eingesetzt. In Abbildung 4.40 ist das Ergebnis dargestellt. Man erkennt deutlich, dass eine Verstärkung des Shifts bei dem Komplex a auftritt, die übrigen Shifts blieben unbeeinflusst (Spur 1). Diese Temperaturabhängigkeit lässt auf einen Aktivierungsenergie benötigenden Vorgang wie Proteindimer-Bildung für Komplex a schließen.

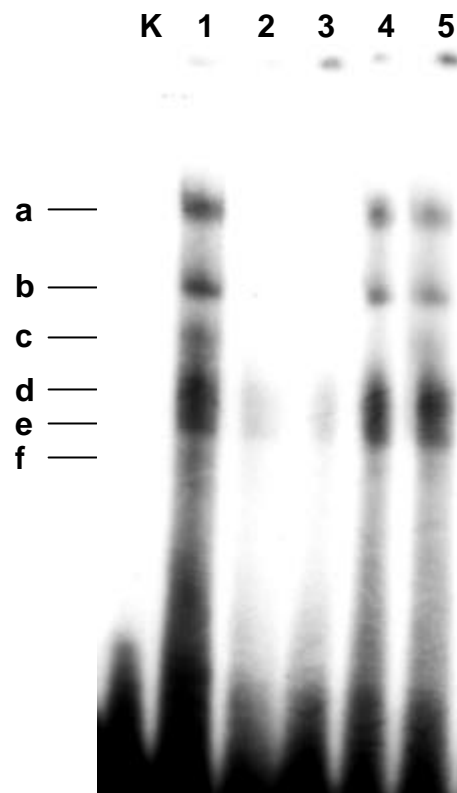


Abb. 4.40: Band Shift Analyse des Promotorabschnittes +3 bis +24 bei Raumtemperatur

K: Kontrolle (nur DNA); Spur 1: Kernproteine ohne Kompetitor-DNA; Spur 2 und 3: Kernproteine mit Oligonukleotid A als Kompetitor-DNA in 20- und 200-fachem Überschuss; Spur 4 und 5: Kernproteine mit Oligonukleotid E als unspezifischer Kompetitor in 20- und 200-fachem Überschuss.

4.8.3.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs +3 bis +24 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Der Promotorbereich wurde auf bekannte Sequenzmotive für Transkriptionsfaktor-Bindestellen mit dem Programm MatInspector professional 5.1 (Quandt et al., 1995) untersucht. Es wurden jeweils die beiden möglichen Orientierungen der Bindungssequenzen in dieser Region berücksichtigt. In der Abbildung 4.41 sind die gefundenen Bindungssequenzen zusammengefasst.

Oligonukleotid A: 5'-CATTCAAGGGCGTGCCTCTCC-3'
3'-ACGTAAGTTCCCGCACGTGAGAGGAGCT-5'

Transkriptionsfaktor	Sequenz	Position
Egr-1	GGCG	+11 bis +14

Abb. 4.41: Kernsequenzen potenzieller Bindestellen innerhalb der Promotorregion +3 bis +24. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Abstand zum Transkriptionsstartpunkt +1.

4.8.4 Band-Shift-Analyse der Promotorregion +6 bis -29

Die Sequenz der Promotorregion +6 bis -29 entspricht dem Oligonukleotid B (siehe Abb. 4.38). Der Band-Shift-Test wurde wie unter Punkt 3.2.17 beschrieben durchgeführt und ist in Abbildung 4.42 dargestellt. In DNase I Footprinting Experimenten wurde der codierende Strang über den kompletten Bereich +6 bis -28 und im nichtcodierenden Strang an zwei Positionen (+6 bis -7 und -12 bis -28) von Kernproteinen gebunden (4.7.2.3).

Die Band-Shift-Analyse in Abbildung 4.42 zeigt, dass in diesem Sequenzbereich fünf Shifts entstanden (A, B, C, D und E; Spur 1). Es galt nun zu beweisen, dass auch die in diesem Promotorabschnitt gefundenen Protein-DNA-Komplexe sequenzspezifisch sind und damit eine genregulatorische Funktion haben könnten.

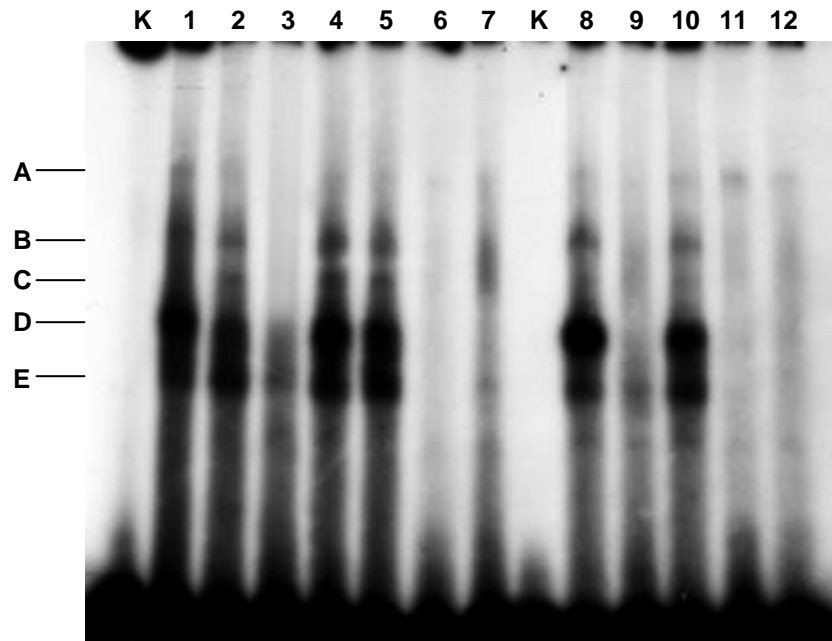


Abb. 4.42: Band-Shift-Analyse des Promotorabschnitts +6 bis -29 auf Eis und bei RT.

Als Band-Shift-Sonde wurde ^{32}P -markiertes Oligonukleotid B verwendet. Es wurde jeweils 3 μg Kernproteine Neuro-2a in die Bindungsansätze eingesetzt und diese auf Eis und RT inkubiert. K: nur DNA, Spur 1: ohne Kompetitor, Spur 2 und 3: homologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid B im 10- und 100fachen Überschuss, Spur 4 und 5: heterologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid I im 10- und 100fachen Überschuss, Spur 6 und 7: Oligonukleotid B, einzelsträngig im 100fachen Überschuss. Spur 8 bis 12: Band Shift Analyse bei RT. Spur 8: ohne Kompetitor; Spur 9: homologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid B im 100fachen Überschuss, Spur 10: heterologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid I im 100fachen Überschuss, Spur 11 und 12: Oligonukleotid B, einzelsträngig im 100fachen Überschuss.

Die Sequenzspezifität wurde mit Hilfe des Kompletions-Tests (siehe 3.2.17 und 4.8.1) überprüft. Die verwendeten Kompetitor-DNAs sind das Oligonukleotid B als homologer Kompetitor und das Oligonukleotid I als heterologer Kompetitor. Es wurde jeweils ein 10facher und 100facher Überschuss der Kompetitor-DNA im Vergleich zur Menge an markierter Band-Shift-Sonde eingesetzt. Für die Einzelstrang-Kompetition wurde der codierende und nichtcodierende Strang des Oligonukleotids B (3.1.14.1) im 100fachen Überschuss eingesetzt.

Der Kompletions-Test in Abbildung 4.42 zeigt, dass die auftretenden Band-Shifts A, B, C, D und E (Spur 1) nur durch homologe Konkurrenz vollständig zu kompetitieren waren (Spur 2 und 3). Die heterologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid I (Spur 4 und 5) führte zu keiner Abnahme der Intensitäten der Band-Shift-Signale. Die beschriebenen Signale sind demnach auf sequenzspezifische DNA-Protein-Wechselwirkungen zurückzuführen. Die einzelsträngige Kompetitor-DNA des codierenden Stranges führte zur Konkurrenz der Band-Shifts B, C, D und E, der Protein-DNA-Komplex A blieb sowohl bei Zugabe des codierenden als auch des nicht codierenden Stranges erhalten. Somit

handelt es sich bei den Shifts B, C, D und E um unspezifische Einzelstrang-bindende Proteine und bei A um ein doppelstrangspezifisches Bindeprotein.

Die Inkubation der Bindungsansätze bei Raumtemperatur (Abb. 4.42) führte zur Verstärkung des Band-Shifts B, was darauf hinweist, dass für die Bildung dieses Komplexes eine Dimerisierung des Bindeproteins nötig ist.

Zusammenfassend konnte ein spezifischer Komplex mit der untersuchten Promotorsequenz beschrieben werden. Vier der Protein-Komplexe (B, C, D und E) sind einzelstrangspezifisch und A bindet spezifisch den Doppelstrang.

4.8.4.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs +6 bis -29 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Der Promotorbereich wurde auf bekannte Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mit dem Programm MatInspector professional 5.1 (Quandt et al., 1995) untersucht. Es wurden jeweils die beiden möglichen Orientierungen der Bindungssequenzen in dieser Region berücksichtigt. In der Abbildung 4.43 sind die gefundenen Bindungssequenzen zusammengefasst.

Oligonukleotid B: 5' - AAAATGTGCAAACAGAAGGAGGGTGAGGCTGCATT - 3'
3' - TTTTACACGTTTGTCTTCCTCCCACTCCGACGTAA - 5'

Transkriptionsfaktor	Sequenz	Position
Muscle Initiator	GCAT	+2 bis +5
AP4	CAGA	-17 bis -14
N-Oct-3	AAAT	-29 bis -26

Abb. 4.43: Kernsequenzen potenzieller Bindestellen innerhalb der Promotorregion +6 bis -29.
Die Positionsangaben beziehen sich auf den Abstand zum Transkriptionsstartpunkt +1 (fett).

4.8.5 Band-Shift-Analyse der Promotorregion -28 bis -61

Das für die Band Shift Analyse verwendete Oligonukleotid C umfasst die Promotorregion von Position -28 bis -61 (Abb. 4.38). In diesem Bereich wurden in den DNase I Footprint Analysen zwei Proteinbindestellen in den Bereichen -36 bis -43 und -46 bis -57, sowie auf dem nichtcodierenden Strang an Position -36 bis -44 und -46 bis -55 ermittelt (4.7.2.3). In Abbildung 4.44 ist das Ergebnis der Band Shift Analyse dargestellt. Es wurden drei Protein-DNA-Komplexe sichtbar. Die Kompetitionsanalysen führten jedoch zu keinem

eindeutigen Ergebnis, so dass in der Band Shift Analyse nicht nachgewiesen werden konnte, ob es sich bei diesen Komplexen um spezifische Protein-Bindungen handelt.

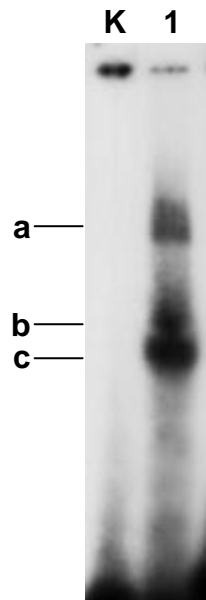


Abb. 4.44: Band Shift Analyse der Promotorregion -28 bis -61

Als Band Shift Sonde wurde ^{32}P markiertes Oligonukleotid C verwendet und jeweils 3 μg Kernproteine aus NGF-induzierten PC-12 Zellen in die Reaktionen eingesetzt. K: nur DNA; Spur 1: Kernproteinextrakt ohne Kompetitor DNA.

4.8.5.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs -28 bis -61 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Der Promotorbereich wurde auf bekannte Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mit dem Programm MatInspector professional 5.1 (Quandt et al., 1995) untersucht. Es wurden jeweils die beiden möglichen Orientierungen der Bindungssequenzen in dieser Region berücksichtigt. In der Abbildung 4.45 sind die gefundenen Bindungssequenzen zusammengefasst.

Oligonukleotid C: 5' -TAAGGCCCCCTTGTCAATGCTTCCTCCACCAA-3'
3' -ATTCCGGGGGAACAGTTACGAAGGAGGTGGTTT-5'

Transkriptionsfaktor	Sequenz	Position
AP1	TGAC	-44 bis -47
Sp1	GGGG	-51 bis -54

Abb. 4.45: Kernsequenzen potenzieller Bindestellen innerhalb der Promotorregion -28 bis -61. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Abstand zum Transkriptionsstartpunkt +1.

4.8.6 Band-Shift-Analyse der Promotorregion –75 bis –95

Die Promotorregion –75 bis –95 entspricht dem Oligonukleotid D (siehe Abb.4.38). Die Band Shift Analyse wurde wie unter Punkt 3.2.17 beschrieben durchgeführt und ist in Abbildung 4.46 dargestellt. Die DNase I Footprinting Analyse zeigte in diesem Bereich eine Proteinbindestelle, die sich im codierenden Strang von Position –81 bis –95 und auf dem nichtcodierenden Strang von Position –80 bis –93 (4.7.2.3, siehe Abb. 4.31 bzw. Abb. 4.36) erstreckt. In der Band Shift Analyse wurden in diesem Bereich zwei Protein-DNA-Komplexe sichtbar (Abbildung 4.46). Die Sequenzspezifität der Proteinbindung wurde durch die Kompetitionsanalyse überprüft. Hierzu wurde das Oligonukleotid D als homologer und Oligonukleotid I als heterologer Kompetitor verwendet. Es wurde jeweils ein 10facher und 100facher molarer Überschuss der Kompetitor-DNA im Vergleich zur Menge an markierter Band Shift Sonde eingesetzt. Für die Einzelstrang-Kompetition wurde der codierende und nichtcodierende Strang des Oligonukleotids D im 100fachen molaren Überschuss eingesetzt.

Die Kompetitionsanalyse in Abbildung 4.46 zeigt, dass die auftretenden Band Shifts a und b (Spur 1) durch homologe Kompetition gelöscht werden konnten (Spur 2 und 3). Unter Verwendung des heterologen Kompetitors Oligonukleotid I blieben die Komplexe bestehen (Spur 4 und 5). Lediglich im 100fachen molaren Überschuss kam es zu einer geringen Abnahme der Shifts a und b. Die Inkubation mit einzelsträngiger Kompetitor-DNA führte mit beiden Strängen zum Verlust der Komplexbildung, so dass die Proteine an den Einzelstrang binden (Spur 6 und 7). Die Promotorregion bildet keinen spezifischen Protein-DNA-Komplex aus. Die Band Shift Analyse bei Raumtemperatur lieferte keine zusätzlichen Signale oder Veränderung des Signalmusters.

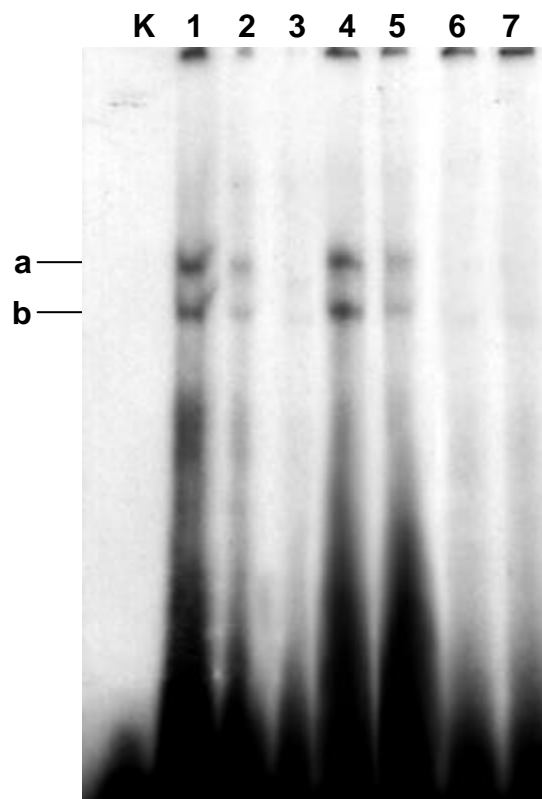


Abb. 4.46: Band Shift Analyse der Promotorregion –75 bis –95

Als Band Shift Sonde wurde ^{32}P markiertes Oligonukleotid D verwendet. Es wurde jeweils 3 μg Kernproteine Neuro-2a in die Bindungsansätze eingesetzt. K: nur DNA; Spur 1: Kernproteinextrakt ohne Kompetitor DNA, Spur 2 und 3: homologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid D, Spur 4 und 5: heterologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid I, Spur 6 und 7: Einzelstrang-Konkurrenz.

4.8.7 Band-Shift-Analyse der Promotorregion –94 bis –128

Das für die Band Shift Analyse verwendete Oligonukleotid E entspricht dem Promotorbereich –94 bis –128 (Abbildung 4.38). Die DNase I Footprinting Analyse in diesem Bereich zeigte zwei Proteinbindungsstellen im codierenden Strang (Position: –98 bis –102 und –105 bis –138) und drei durch Proteine geschützte Regionen im nichtcodierenden Strang (Position: –95 bis –102, –105 bis –114 und –121 bis –138, siehe 4.7.2.3). In der Abbildung 4.48 ist das Ergebnis der Band Shift Analyse dargestellt. Es traten drei Shifts auf (Spur 1). Zur Überprüfung der Sequenzspezifität wurde eine homologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid E, eine heterologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid I und eine homologe Einzelstrang-Konkurrenz durchgeführt. Der Konkurrenztest zeigte zwei spezifische DNA-Protein-Komplexe A und C innerhalb des untersuchten Promotorabschnittes. Eine spezifische Proteinbindung ist wahrscheinlich, da diese Shifts durch Zugabe von Oligonukleotid E aufgehoben werden konnten (Abb. 4.47,

Spur 2 und 3), wohingegen sie nach Zugabe des Oligonukleotids I im 100fachen molaren Überschuss als Band Shift sichtbar blieben (Abb. 4.47, Spur 4). Im Gegensatz dazu ist der Komplex B nach Zugabe der heterologen Kompetitor-DNA nicht mehr sichtbar (Abb. 4.47, Spur 3 und 4). Nach Zugabe der Einzelstrang-Kompetitoren (Spur 6 und 7) blieben beide Shifts A und C bestehen, so dass es sich um spezifische Doppelstrang-bindende Proteine handelt.

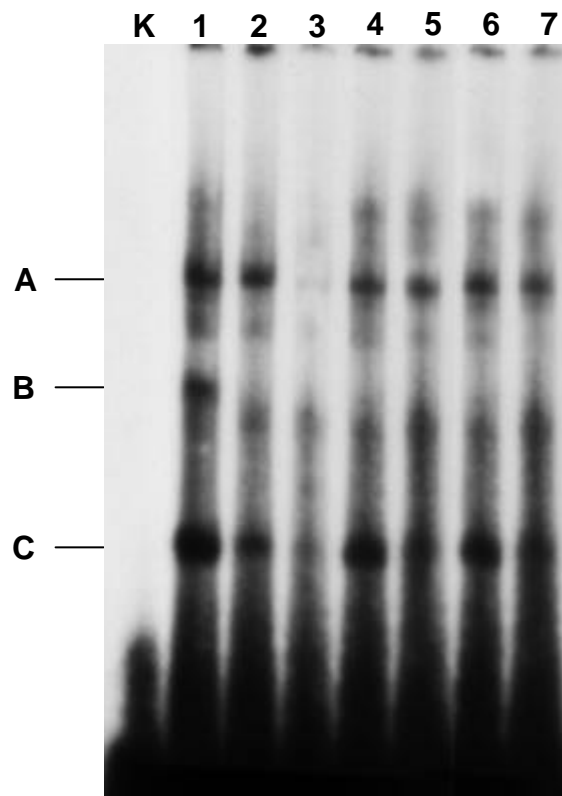


Abb. 4.47: Band Shift Analyse der Promotorregion -94 bis -128

Als Band Shift Sonde wurde ^{32}P markiertes Oligonukleotid E verwendet. Jeweils mit 3 μg Kernproteinen sowohl in Eis als auch auf Raumtemperatur inkubiert. K: nur DNA; Spur 1: Kernproteinextrakt ohne Kompetitor DNA, Spur 2 und 3: homologe Competition mit dem Oligonukleotid E, Spur 4 und 5: heterologe Competition mit dem Oligonukleotid I. Spur 6 und 7: homologe Einzelstrang-Kompetition.

4.8.7.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs -94 bis -128 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Der Promotorbereich wurde auf bekannte Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mit dem Programm MatInspector professional 5.1 (Quandt et al., 1995) untersucht. Es wurden jeweils die beiden möglichen Orientierungen der Bindungssequenzen in dieser Region berücksichtigt. In der Abbildung 4.48 sind die gefundenen Bindungssequenzen zusammengefasst.

Oligonukleotid E: 5' -GCCCTAGAAAATGCAAAAAGTGAATAAATAAGGAA-3'
 3' -CGGGATCTTTTACGTTTTTCACTTATTTATTCCTT-5'

Transkriptionsfaktor	Sequenz	Position
Pit1	ATTC	-104 bis -107
AP1	TTATTCA	-102 bis -108
MEF2	TAAA	-105 bis -108
Oct-6	AATA	-106 bis -109
CDP	AAAA	-118 bis -121
HNF3 β	AAAA	-118 bis -121
N-Oct 3	AAAT	-120 bis -117

Abb. 4.48: Kernsequenzen potenzieller Bindestellen innerhalb der Promotorregion -94 bis -128. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Abstand zum Transkriptionsstartpunkt +1.

4.8.8 Band-Shift-Analyse der Promotorregion -129 bis -162

Die Promotorregion -129 bis -162 entspricht dem Oligonukleotid F (siehe Abb. 4.38). Die Band Shift Analyse wurde wie unter Punkt 4.8.1 beschrieben durchgeführt und ist in Abbildung 4.49 dargestellt. Die DNase I Footprinting Analyse zeigte in diesem Bereich zwei Proteinbindestellen im codierenden (Position -129 bis -140 und Position -133 bis -148) und eine im nichtcodierenden Strang (Position -121 bis -138, siehe Abb. 4.35). In der Band Shift Analyse wurde in diesem Bereich ein Protein-DNA-Komplex ermittelt (Abbildung 4.49). Die Sequenzspezifität der Proteinbindung wurde durch Kompetitionsanalysen überprüft. Hierzu wurde das Oligonukleotid F als homologer und Oligonukleotid A als heterologer Kompetitor verwendet. Es wurde jeweils ein 10facher und 100facher molarer Überschuss der Kompetitor-DNA im Vergleich zur Menge an markierter Band Shift Sonde eingesetzt. Für die Einzelstrang-Kompetition wurde der codierende und nichtcodierende Strang des Oligonukleotids F im 100fachen molaren Überschuss eingesetzt.

Die Kompetitionsanalyse zeigte eine spezifische Proteinbindung, denn die homologe Kompetition führte zu einer deutlichen Abschwächung des Band Shift (Abb. 4.49, Spur 3). Hingegen blieb der Band Shift bei der heterologen Kompetition unbeeinflusst (Abb. 4.49, Spur 4-5). Die einzelstrangspezifische Kompetition führte weder bei Verwendung des codierenden noch des nichtcodierenden Stranges zur Entfernung des Band Shift, so dass es sich bei diesem um eine doppelstrangspezifische Bindung handelt.

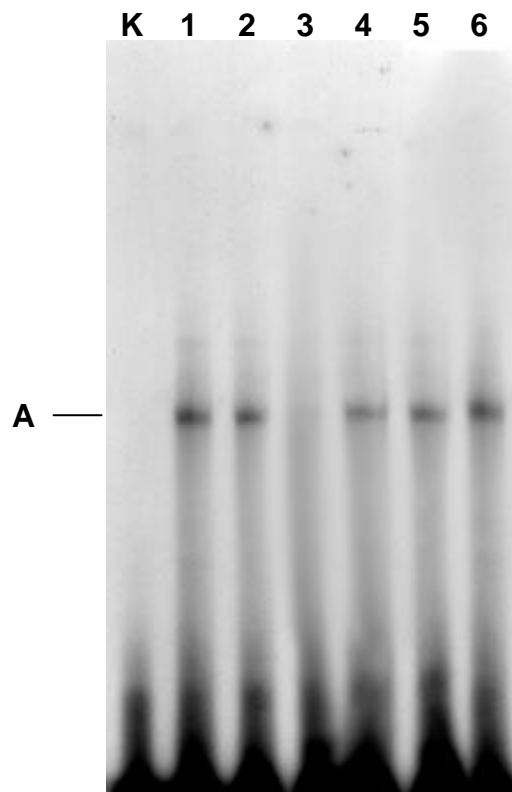


Abb. 4.49: Band Shift Analyse der Promotorregion –129 bis –162

Als Band Shift Sonde wurde ^{32}P markiertes Oligonukleotid F verwendet. Es wurde jeweils mit 3 μg Kernproteinen Neuro-2a inkubiert. K: nur DNA; Spur 1: Kernproteinextrakt ohne Kompetitor DNA, Spur 2 und 3: homologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid F, Spur 4 und 5: heterologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid A, Spur 6: Einzelstrang-Konkurrenz.

Die Band Shift Analyse bei RT ergab keine zusätzlichen Signale oder Veränderungen des Signalmusters.

4.8.8.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs -129 bis -162 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Der Promotorbereich wurde auf bekannte Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mit dem Programm MatInspector professional 5.1 (Quandt et al., 1995) untersucht. Es wurden jeweils die beiden möglichen Orientierungen der Bindungssequenzen in dieser Region berücksichtigt. In der Abbildung 4.50 sind die gefundenen Bindungssequenzen zusammengefasst.

Oligonukleotid F: 5' - CCTAGCCTGGGAACCTCCATACGCTGCAGGTGCG - 3'
3' - GGATCGGACCCTTGGAGGTATGCGACGTCCACGC - 5'

Transkriptionsfaktor	Sequenz	Position
AP4	CAGG	-136 bis -133
HEN1	CCTG	-133 bis -136

Abb. 4.50: Kernsequenzen potenzieller Bindestellen innerhalb der Promotorregion -129 bis -162. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Abstand zum Transkriptionsstartpunkt +1.

4.8.9 Band-Shift-Analyse der Promotorregion -160 bis -183

Das für die Band Shift Analyse verwendete Oligonukleotid G entspricht dem Promotorbereich -160 bis -183 (Abb. 4.38). In der Abbildung 4.51 ist das Ergebnis der Band Shift Analyse dargestellt. Es traten vier Shifts auf (a, b, c und d, Spur 1). Zur Überprüfung der Sequenzspezifität wurde eine homologe Kompetition mit dem Oligonukleotid G, eine heterologe Kompetition mit dem Oligonukleotid I und eine homologe Einzelstrang Kompetition durchgeführt. Der Kompetitionstest zeigte, dass alle vier Band Shifts a, b, c und d spezifische DNA-Protein-Komplexe innerhalb des untersuchten Promotorabschnittes sind. Eine spezifische Proteinbindung ist wahrscheinlich, da diese Shifts durch Zugabe von Oligonukleotid G gelöscht werden konnten (Abb. 4.51, Spur 2 und 3), wohingegen sie nach Zugabe des Oligonukleotids I im 100fachen molaren Überschuss als Band Shift sichtbar blieben (Abb. 4.51, Spur 4 und 5). Die Komplexe a und c wurden sowohl bei 100fachem molaren Überschuss des codierenden Stranges (Abb. 4.51, Spur 6) als auch des nichtcodierenden Stranges (Abb. 4.51, Spur 7) nicht kompetitiert, was auf eine doppelstrangspezifische Proteinbindung schließen lässt. Hingegen führte die Einzelstrang Kompetition der Komplexe b und d bei beiden Strängen zur Aufhebung des Band Shifts, so dass diese unspezifische Proteinbindungen sind. Die DNase I Footprinting Analysen führte in diesem Promotorbereich zu einer Proteinbindung an Position -157 bis -178 des codierenden Stranges (4.7.4, siehe Abb. 4.33 und Abb. 4.34).

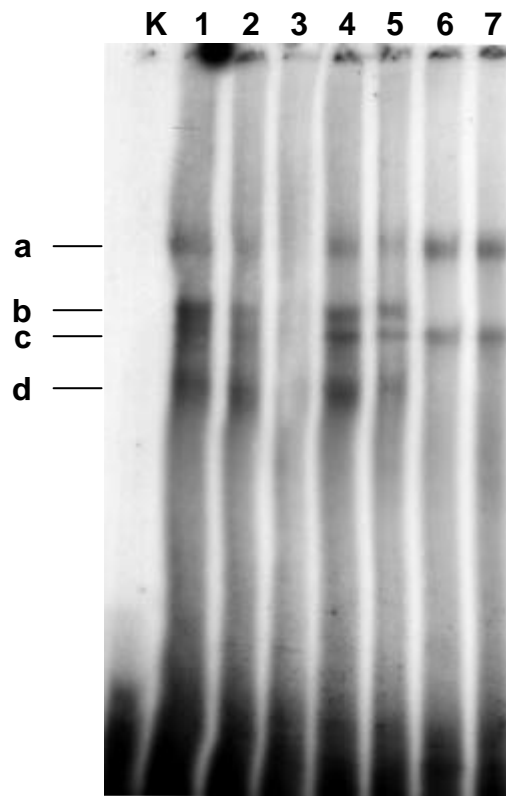


Abb. 4.51: Band-Shift-Analyse des Promotorabschnitts -160 bis -183.

Als Band-Shift-Sonde wurde ^{32}P -markiertes Oligonukleotid G verwendet. Es wurde jeweils 3 μg Kernproteine aus Neuro-2a Zellen in die Bindungsansätze eingesetzt und diese bei Raumtemperatur inkubiert. K: nur DNA, Spur 1: ohne Kompetitor, Spur 2 und 3: homologe Competition mit dem Oligonukleotid G, Spur 4 und 5: heterologe Competition mit dem Oligonukleotid I, Spur 6 und 7: Oligonukleotid G einzelsträngig.

Die Band Shift Analyse bei Raumtemperatur lieferte keine zusätzlichen Signale oder Veränderung des Signalmusters.

4.8.9.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs -160 bis -183 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Der Promotorbereich wurde auf bekannte Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mit dem Programm MatInspector professional 5.1 (Quandt et al., 1995) untersucht. Es wurden jeweils die beiden möglichen Orientierungen der Bindungssequenzen in dieser Region berücksichtigt. In der Abbildung 4.52 sind die gefundenen Bindungssequenzen zusammengefasst.

Oligonukleotid G: 5' -GGCTACAGCTCCAATTGGACCCCT-3'
3' -CCGATGTCGAGGTTAACCTGGGGA-5'

Transkriptionsfaktor	Sequenz	Position
AP2	CCCC	-161 bis -164
Oct-6	AATT	-168 bis -171
AP4	CAGC	-175 bis -178

Abb. 4.52: Kernsequenzen potenzieller Bindestellen innerhalb der Promotorregion -160 bis -183. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Abstand zum Transkriptionsstartpunkt +1.

4.8.10 Band-Shift-Analyse der Promotorregion –184 bis –208

Die Promotorregion –184 bis –208 wird mit dem Oligonukleotid H erfasst (siehe Abb.4.38). Die Band Shift Analyse wurde wie unter Punkt 4.8.1 beschrieben durchgeführt und ist in Abbildung 4.53 dargestellt. Die DNase I Footprinting Analyse zeigte in diesem Bereich eine Proteinbindestellen an Position –185 bis –208 (4.7.4, siehe Abb. 4.33). In der Band Shift Analyse wurden mit dem Oligonukleotid H drei Protein-DNA-Komplexe sichtbar (Abbildung 4.53, Spur 1). Die Sequenzspezifität der Proteinbindungen wurde durch Kompetitionsanalysen überprüft. Hierzu wurde das Oligonukleotid H als homologer und Oligonukleotid I als heterologer Kompetitor verwendet. Es wurde jeweils ein 10facher und 100facher molarer Überschuss der Kompetitor-DNA im Vergleich zur Menge an markierter Band Shift Sonde eingesetzt. Für die Einzelstrang-Kompetition wurde der codierende und nichtcodierende Strang des Oligonukleotids H jeweils im 100fachen molaren Überschuss eingesetzt.

Die Kompetitionsanalyse zeigte eine spezifische Proteinbindung des Komplexes a, b und c, denn mit dem homologen Kompetitor wurden die Band Shifts vollständig kompetitiert (Abb. 4.53, Spur 2-3). Hingegen blieben die Band Shifts bei der heterologen Konkurrenz unbeeinflusst (Abb.4.53, Spur 4-5). Die einzelstrangspezifische Konkurrenz führte bei Komplex a und c sowohl unter Verwendung des codierenden Stranges als auch des nichtcodierenden Stranges zur Entfernung der Band Shifts, so dass es sich bei diesen um einzelstrangspezifische Bindungen handelt (Abb. 4.53, Spur 4-5). Hingegen blieb der Band Shift b in der Einzelstrang-Kompetition erhalten, was auf eine doppelstrangspezifische Bindung schließen lässt (Abb. 4.53, Spur 6-7).

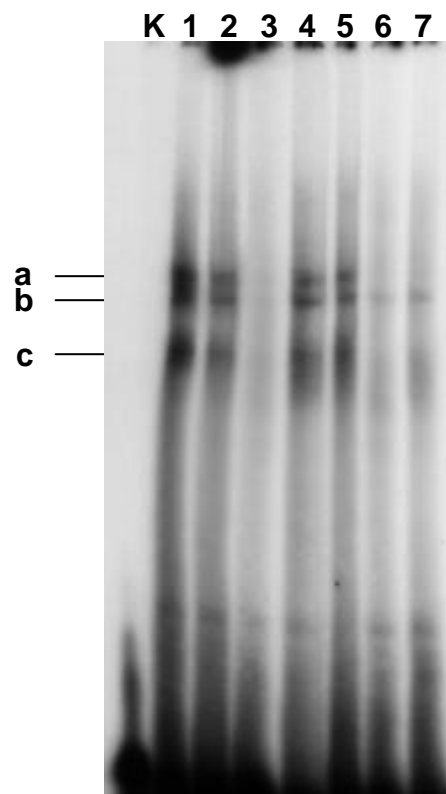


Abb. 4.53: Band-Shift-Analyse des Promotorabschnitts -184 bis -208.

Als Band-Shift-Sonde wurde ^{32}P -markiertes Oligonukleotid H verwendet. Es wurde jeweils 3 μg Kernproteine aus NGF induzierten PC12 Zellen in die Bindungsansätze eingesetzt und diese bei Raumtemperatur inkubiert. K: nur DNA, Spur 1: ohne Kompetitor, Spur 2 und 3: homologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid H, Spur 4 und 5: heterologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid I, Spur 6 und 7: Oligonukleotid H, einzelsträngig.

Die Band Shift Analyse bei Raumtemperatur ergab keine zusätzlichen Signale oder Veränderung des Signalmusters.

4.8.10.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs -184 bis -208 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Der Promotorbereich wurde auf bekannte Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mit dem Programm MatInspector professional 5.1 (Quandt et al., 1995) untersucht. Es wurden jeweils die beiden möglichen Orientierungen der Bindungssequenzen in dieser Region berücksichtigt. In der Abbildung 4.54 sind die gefundenen Bindungssequenzen zusammengefasst.

Oligonukleotid H: 5' - TCCTGTGGCTGTGGTGTAGGCCAGG - 3'
 3' - AGGACACCGACACCACATCCGGTCC - 5'

Transkriptionsfaktor	Sequenz	Position
Egr-2	GTGT	-192 bis -195

Abb. 4.54: Kernsequenzen potenzieller Bindestellen innerhalb der Promotorregion -184 bis -208. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Abstand zum Transkriptionsstartpunkt +1.

4.8.11 Band-Shift-Analyse der Promotorregion -207 bis -229

Das für die Band Shift Analyse verwendete Oligonukleotid I umfasst den Promotorbereich -207 bis -229. In der Abbildung 4.55 ist das Ergebnis der Band Shift Analyse dargestellt. Es traten zwei Shifts auf (Spur 1). Zur Überprüfung der Sequenzspezifität wurde eine homologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid I, eine heterologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid D und eine homologe Einzelstrang-Konkurrenz durchgeführt. Der Konkurrenztest zeigte, dass alle zwei Band Shifts a und b spezifische DNA-Protein-Komplexe innerhalb des untersuchten Promotorabschnittes sind. Eine spezifische Proteinbindung ist wahrscheinlich, da diese Shifts durch Zugabe von Oligonukleotid I gelöscht werden konnten (Abb. 4.55, Spur 2 und 3), wohingegen sie nach Zugabe des heterologen Oligonukleotids D im 100fachen molaren Überschuss als Band Shift sichtbar blieben (Abb. 4.55, Spur 4). Die Komplexe a und b wurden bei 100fach molaren Überschuss des codierenden Stranges als auch des nichtcodierenden Stranges nicht kompetitiert, was auf eine doppelstrangspezifische Proteinbindung schließen lässt. Die Band Shift Analyse bei Raumtemperatur ergab keine zusätzlichen Signale oder Veränderung des Signalmusters. Die DNase I Footprinting Analysen führten in diesem Promotorbereich zu einer Proteinbindung von Position -185 bis -218 (4.7.4, siehe Abb. 4.33 und Abb. 34).

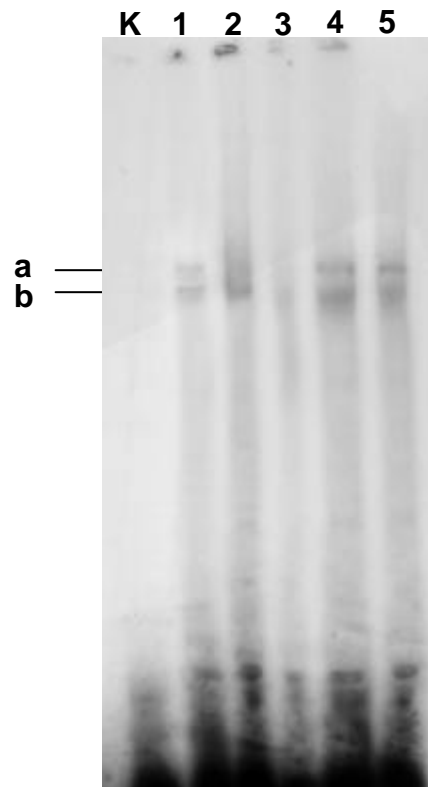


Abb. 4.55: Band-Shift-Analyse des Promotorabschnitts -207 bis -229.

Als Band-Shift-Sonde wurde ^{32}P -markiertes Oligonukleotid I verwendet. Es wurde jeweils 3 μg Kernproteine aus NGF induzierten PC-12 Zellen in die Bindungsansätze eingesetzt und diese bei Raumtemperatur inkubiert. K: nur DNA, Spur 1: ohne Kompetitor, Spur 2 und 3: homologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid I, Spur 4 und 5: heterologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid D.

4.8.11.1 Sequenzanalyse des Promotorbereichs -207 bis -229 auf potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Der Promotorbereich wurde auf bekannte Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mit dem Programm MatInspector professional 5.1 (Quandt et al., 1995) untersucht. Es wurden jeweils die beiden möglichen Orientierungen der Bindungssequenzen in dieser Region berücksichtigt. In der Abbildung 4.56 sind die gefundenen Bindungssequenzen zusammengefasst.

Oligonukleotid I: 5`-GTTTCGATCCCTGGCCTCGCTTTC-3`
3`-CAGACTAGGGACCGGAGCGAAAG-5`

Transkriptionsfaktor	Sequenz	Position
NFAT	GAAA	-207 bis -210
IK2	GGGA	-220 bis -223

Abb. 4.56: Kernsequenzen potenzieller Bindestellen innerhalb der Promotorregion -207 bis -229. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Abstand zum Transkriptionsstartpunkt +1.

4.8.12 Band-Shift-Analyse der Promotorregion -230 bis -258

Die Sequenz der Promotorregion -230 bis -258 entspricht dem Oligonukleotid J (siehe Abb. 4.38). Der Band-Shift-Test wurde wie unter Punkt 3.2.17 beschrieben durchgeführt und ist in Abbildung 4.57 dargestellt.

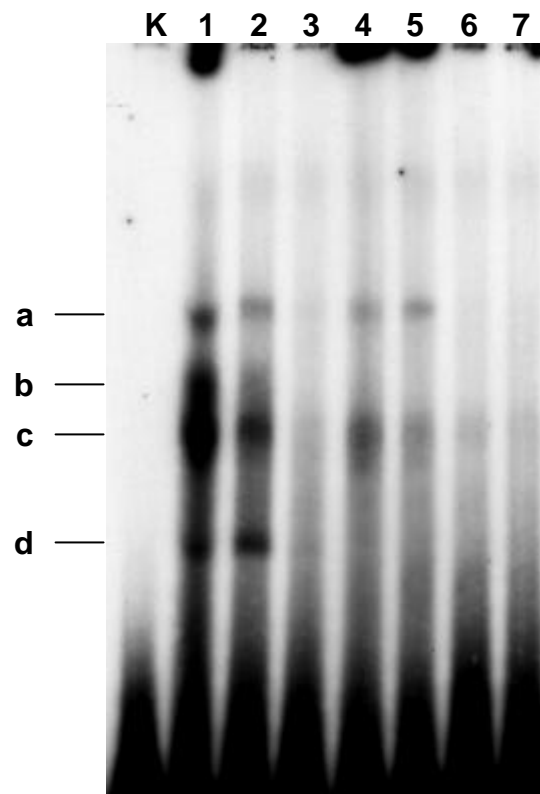


Abb. 4.57: Band-Shift-Analyse des Promotorabschnitts -230 bis -258.

Als Band-Shift-Sonde wurde ^{32}P -markiertes Oligonukleotid J verwendet. Es wurde jeweils 3 μg Kernproteine Neuro-2a in die Bindungsansätze eingesetzt und diese auf Eis inkubiert. K: nur DNA, Spur 1: ohne Kompetitor, Spur 2 und 3: homologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid J, Spur 4 und 5: heterologe Konkurrenz mit dem Oligonukleotid I, Spur 6 und 7: Oligonukleotid J, einzelsträngige Konkurrenz.

Die Band-Shift-Analyse in der Abbildung 4.57 zeigt, dass mit diesem Promotorfragment vier Shifts entstanden (Spur 1). Es galt nun zu beweisen, dass auch die in diesem Promotorabschnitt gefundenen Protein-DNA-Komplexe sequenzspezifisch sind und damit

eine genregulatorische Funktion haben könnten. Die Sequenzspezifität wurde mit Hilfe des Kompetitions-Tests (siehe 3.2.17 und 4.8.1) überprüft. Die verwendeten Kompetitor-DNAs sind das Oligonukleotid J als homologer und das Oligonukleotid I als heterologer Kompetitor. Es wurde jeweils ein 10facher und 100facher Überschuss der Kompetitor-DNA im Vergleich zur Menge an markierter Band-Shift-Sonde eingesetzt. Für die Einzelstrang-Kompetition wurde der codierende und nichtcodierende Strang des Oligonukleotids J (3.1.14.1) im 100fachen Überschuss eingesetzt.

Der Kompetitions-Test in Abbildung 4.57 zeigt, dass die auftretenden Band-Shifts a und c (Spur 1) nur durch homologe Competition zu kompetitieren waren (Spur 2 und 3). Die heterologe Competition mit dem Oligonukleotid I (Spur 4 und 5) führte zur Abnahme der Intensitäten der Band-Shift-Signale. Die beschriebenen Band Shifts sind demnach auf sequenzunspezifische DNA-Protein-Wechselwirkungen zurückzuführen. Die einzelsträngige Competition zeigte ebenfalls, dass es sich um unspezifische Einzelstrang-Bindungen handelt (Abb. 4.57, Spur 6 und 7).

5 Diskussion

Ausgehend von einem cDNA-Fragment, das aus einer subtraktiven cDNA-Bank zur Identifizierung Blut-Hirn-Schranke-spezifischer Proteine isoliert wurde, konnten zwei mRNA-Sequenzen (*tmp* und *sp* 83.5) charakterisiert werden, die ausschließlich im Gehirn gebildet werden. *In situ* Hybridisierungen zeigten, dass der zelluläre Bildungsort beider Transkripte verschiedene Neurontypen in der Klein- und Großhirnrinde des Schweinegehirns sind. Bestätigt wurde der neuronale Ursprung durch immunhistochemische Untersuchungen. Die Transkripte codieren für ein potenzielles Transmembranprotein TMP 83.5 sowie für dessen lösliche Isoform SP 83.5 (siehe Abschnitt 2.7). Anhand der mRNA- bzw. cDNA-Sequenzen konnte das Gen 83.5, das in einer einzigen Kopie im haploiden Schweinegenom vorliegt, isoliert und die genomische Sequenz bestimmt werden. Die Korrelation der genomischen Sequenz mit den jeweiligen cDNA-Sequenzen ergab, dass die mRNAs *tmp* und *sp* 83.5 nicht die Produkte alternativen Spleißens eines gemeinsamen Primärtranskripts sind. Das individuelle 5'-Ende der mRNA *sp* 83.5 ist Teil des zweiten Introns. Die Transkripte werden demnach von zwei Transkriptionsstartpunkten aus gebildet und stehen unter der Transkriptionskontrolle verschiedener Promotoren. Der Transkriptionsstartpunkt, von dem aus die mRNA-Synthese beginnt, konnte bereits für die mRNA *tmp* 83.5 bestimmt werden. Der Promotor *tmp* 83.5 erstreckt sich vom 5'-Ende bis zur Position 4.607 des Gens 83.5.

Zur vollständigen Sequenz- und Strukturaufklärung des Gens 83.5 sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Transkriptionsstartpunkt für die Synthese der mRNA *sp* 83.5 identifiziert sowie durch Computeranalysen in der daraus eingegrenzten Promotorregion *sp* 83.5 potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ermittelt werden.

Der sich daran anschließende Teil der Arbeit hatte zum Ziel, funktionelle Kontrollregionen der Transkription des Promotors *tmp* 83.5 zu identifizieren.

5.1 Der Startpunkt der Transkription für die Synthese der mRNA *sp* 83.5

Die Bestimmung der Startstelle der Transkription ist die Voraussetzung zur gezielten Analyse der Promotorregion. Zur Transkriptionsstartbestimmung wurde die Methode der *Primer Extension* gewählt. Nach diesem Verfahren wird RNA als Matrize für die enzymatische Verlängerung eines radioaktiv markierten Oligonukleotidprimers mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase eingesetzt. Die hierbei als Reaktionsprodukt entstehende cDNA endet exakt am 5'-Ende der mRNA. Die Größe des Produktes lässt sich anschließend durch die parallele Auftrennung der gebildeten cDNA und einer Sequenzierungsreaktion in einem denaturierenden Polyacrylamidgel ermitteln.

Um einen möglichst großen Sequenzbereich für die Transkriptionsstartpunktbestimmung abzudecken und zur Bestätigung der Ergebnisse, wurden fünf Oligonukleotide aus dem bekannten 5'-Bereich der cDNA-Sequenz abgeleitet, radioaktiv markiert und als Primer in die Reverse Transkriptase Reaktion eingesetzt. Problematisch bei der Ableitung der Oligonukleotidprimer war die im individuellen 5'-Bereich der cDNA *sp* 83.5 vorliegende SINE (short interspersed repeats) -Sequenz. SINE-Sequenzen sind Retroposons, die ursprünglich von Transkripten der RNA Polymerase III stammen. Diese mittelrepetitiven Sequenzen liegen im gesamten Genom des Schweins verteilt vor und treten auch in Transkripten auf (Makalowski, 1995). Sequenzanalysen des 5'-Endes der bereits bekannten cDNA-Sequenz der mRNA *sp* 83.5 zeigten, dass es sich bei den 5'-gelegenen ersten 166 Nukleotiden um eine SINE-Sequenz handelt (siehe Abschnitt 4.1; Frengen et al., 1991). So verblieben für die Ableitung sequenzspezifischer Oligonukleotidprimer aus dem bekannten 5'-Bereich lediglich 138 Nukleotide bis zur gemeinsamen Sequenz beider Transkripte des 83.5-Gens. Aus diesem Bereich konnten die Oligonukleotidprimer PE03, PE04 und PE05 abgeleitet werden. Mit allen drei Oligonukleotidprimern wurde ein spezifisches cDNA-Produkt in der *Primer Extension* Reaktion erhalten. Der Oligonukleotidprimer PE02 wurde aus dem Übergangsbereich der SINE zur individuellen Sequenz der mRNA *sp* 83.5 abgeleitet. Somit beinhaltete dieser Primer noch 13 Nukleotide der SINE-Sequenz, mit der er hybridisieren konnte. Der Oligonukleotidprimer PE01 hybridisierte vollständig innerhalb der SINE Sequenz. Aufgrund der Tatsache, dass die Oligonukleotidprimer PE01 und PE02 innerhalb der SINE Sequenz lagen, und somit mit allen porcinen Transkripten, die SINE-Sequenzen enthalten, hybridisieren können, entstanden nach der *Primer Extension* Reaktion erwartungsgemäß zahlreiche cDNA-Produkte. Die stärksten Signale, die mit den Primern PE01 und PE02 erzielt wurden entsprechen jedoch der Position des Transkriptionsstartpunktes, wie er mit den Oligonukleotidprimern PE03 und PE05 bestimmt wurde. Verkürzte cDNA-Produkte, die 6, 10, 16 und 78 Nukleotide von diesem Startpunkt entfernt lagen, und mit den Primern PE01, PE02 und PE04 erhalten wurden (siehe Abb. 4.6), deuten auf vorzeitige Abbrüche der Reversen Transkriptase Reaktion aufgrund von Sekundärstrukturen in der RNA hin. Computeranalysen der mRNA-Sequenz mit dem Programm DNASIS v2.5 zeigten, dass im 5'-Bereich stabile Stamm-Schleifen-Strukturen ausgebildet werden können, die zu einem solchen vorzeitigen Abbruch der Enzymreaktion führen.

Die *Primer Extension* Analyse legte den Transkriptionsstartpunkt für die Synthese der mRNA *sp* 83.5 fest und definierte gleichzeitig die vollständige Sequenz dieses Transkriptes. Die Sequenz wurde im 5'-Bereich um 42 Nukleotide erweitert, so dass sich eine Gesamtlänge von 2.374 nt ergibt. Der individuelle 5'-Bereich der mRNA *sp* 83.5 beträgt nun 346 Nukleotide (Exon 3a) und innerhalb der genomischen Sequenz liegt der Startpunkt der Transkription an Position 13.779 (siehe Anhang 7.1). Der abgeleitete offene

Leserahmen für dieses Protein erstreckt sich innerhalb der mRNA *sp* 83.5-Sequenz von Position 596 bis 733 (Bangsow et al., 1998). Daraus ergibt sich eine 5'-nichttranslatierter Region von 595 nt und eine 3'-nichttranslatierter Region von 1.641 nt, d.h. nur 6 % dieser mRNA sind codierend. Das AUG-Startcodon für den offenen Leserahmen ist das neunte Translationsstartcodon in diesem Transkript. Das ist ungewöhnlich, da stromaufwärts gelegene Translationsstartcodons statistisch nur in 10 % aller bekannten Vertebraten-Gene vorkommen und die 5'-UTR normalerweise nur 20 bis 100 bp umfasst (Kozak, 1987). Eine längere 5'-UTR wird nur bei 25 % aller Vertebraten-Gene gefunden. Die häufigsten Abweichungen von dieser Statistik sind bei den Proto-Onkogenen zu beobachten, alle anderen Abweichungen betreffen keine definierte Gruppe von Genen. Proto-Onkogene codieren für Wachstumsfaktoren, Membranrezeptoren, Proteinen der cytoplasmatischen Signaltransduktion, Tumorsuppressorgene und Transkriptionsfaktoren. Interessanterweise werden die Proto-Onkogene im Nervensystem sehr stark exprimiert, besonders im Hippocampus nach Krampfaktivitäten durch epileptische Anfälle (Herdegen, 1996).

Der Vergleich der cDNA-Sequenz des Transkriptes *sp* 83.5 mit Sequenzen in Nukleinsäuredatenbanken ergab eine signifikante Homologie zu dem humanen Transkript HTMP10 (Nobile et al., 2002, siehe Abschnitt 4.4). Das Gen HTMP10 ist auf dem Chromosom 10 in der Region q24 lokalisiert. In diesem Chromosomenabschnitt befinden sich mehrere Gene, die in Zusammenhang mit neurologischen Krankheiten wie der spastischen Paraparese und einer vererbaren Form der Epilepsie, der sogenannten Temporallappen-Epilepsie stehen (Nobile und Pitzalis, 1999). Die Identität der codierenden Sequenzen beider Transkripte beträgt 82 Prozent (*sp* 83.5: 596-733; HTMP: 695-833) und die aus dem offenen Leserahmen abgeleitete Aminosäuresequenz beider Proteine 80 Prozent (*sp* 83.5: 1-46; HTMP10: 96-141).

Die hohe Sequenzidentität zu dem neuronalen Gen HTMP10 und die außergewöhnlich lange 5'-UTR, die hauptsächlich in Proto-Onkogenen beobachtet wird (und im Nervensystem stark exprimiert werden), legt die Vermutung nahe, dass das Gen 83.5 in Zusammenhang mit bestimmten Epilepsien stehen könnte.

5.2 Der Promotor *sp* 83.5

Nachdem der Transkriptionsstartpunkt für die mRNA *sp* 83.5 bestimmt und somit der Übergang zwischen Strukturgen und Promotor festlag, sollte die Promotorregion durch computergestützte Analysen auf potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Hierzu wurde ein Bereich von 635 Basenpaaren herangezogen, der sich 24 bp stromabwärts und 611 bp stromaufwärts des ermittelten Transkriptionsstartpunktes erstreckt. Analysiert wurde die Region mit dem Programm MatInspector professional, das eine Sammlung von ca. 400 charakterisierten Transkriptionsfaktoren und der DNA-Erkennungssequenzen enthält (Quandt et al., 1995). Die Lage der Bindungsstellen in der

Sequenz des Promotorabschnittes und die Zuordnung der Transkriptionsfaktoren ist im Abschnitt 4.3 in der Abbildung 4.7 dargestellt.

Interessanterweise befindet sich am Startpunkt der Transkription +1 ein Initiatorelement, der Muscle-Initiator (Muscle-INI), das man erstmals in Promotoren von Muskelgenen wie Aktin, Myosin und Acetylcholin-Rezeptoren fand. Mittlerweile wurde dieser Initiator auch in den Promotoren des Acetylcholinesterase-Gens und der Aldolase C beschrieben (Lopez und Fickett, Homepage). Die Acetylcholinesterase wird in Muskel- und Nervenzellen exprimiert, während Aldolase C ausschließlich im Nervensystem exprimiert wird. An Position -25 bis -30 befindet sich keine TATA-Box. Zwar liegen 48 bp stromaufwärts des Startpunktes zwei mögliche TATA-Boxen in einer AT-reichen Region, jedoch sind diese zu weit entfernt, um funktionell wirksam zu sein. Der Abstand zum Startpunkt ist nämlich eine wesentliche Voraussetzung für die exakte Positionierung des RNA Polymerase II Holoenzymkomplexes (Burley und Roeder, 1996). Weitere typische Kernpromotor-Bindestellen wie die TFIIB Erkennungssequenz BRE an Position -32 (Lagrange et al., 1998) und das Downstream Sequence Element DSE an Position +30 (Burke und Kadonaga, 1997) sind nicht vorhanden. Damit wird in dem Promotor *sp* 83.5 der Startpunkt und die Direktionalität der Transkription alleine durch den Initiator festgelegt. Das Initiatorelement bestätigt darüber hinaus den experimentell ermittelten Startpunkt der Transkription.

Der proximale und distale Promotor enthält eine Vielzahl zellspezifisch wirkender Bindestellen für Aktivatoren und Repressoren, aber keine typischen Elemente wie sie bei ubiquitär konstitutiv exprimierten Haushaltsgenen zu finden sind. CAAT-Box und GC-Box sind die typischen Elemente für eine konstitutive, ubiquitäre Expression (Novina und Roy, 1996). Ihr Fehlen steht gut im Einklang mit der neuronalspezifischen Synthese der mRNA *sp* 83.5.

Dies zeigt sich besonders deutlich durch die hohe Zahl potenzieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die zell- oder gewebespezifisch wirken. Diese sind in der Tabelle 5.1 aufgelistet. Die Transkriptionsfaktoren der Ikaros-Familie IK2 und IK3 werden neben dem hämatopoetischen System nur in einem Gehirnnareal, dem Corpus striatum, exprimiert. Die regulatorische Funktion der Ikaros-Faktoren in diesem Gehirnnareal ist nicht bekannt. Die neuronal oder glial exprimierten Transkriptionsfaktoren sind in der untersuchten Promotorregion mehrmals vertreten (siehe Abb. 4.7). In der Promotorregion sind Bindestellen für gehirnspezifische Aktivatoren und Repressoren vorhanden (Tab. 5.1). Während der induzierbare Transkriptionsaktivator AP2 zellspezifisch in Neuronen exprimiert wird, werden AP1 und AP4 ubiquitär exprimiert. Die AP1 und AP4 Transkriptionsfaktoren bilden synergistische Module, die häufig in Enhancern vertreten sind. Die spezielle Architektur der Module bestimmt dann die zellspezifische Transkriptionsaktivität (siehe auch 2.5.4.1). Jedoch ist ihre Zahl nach bestimmten Stimuli im Nervensystem besonders hoch. In der Promotorsequenz ebenfalls stark vertreten sind

Sequenzelemente für Transkriptionsfaktoren, die über Steroidhormone induziert werden. Hierzu zählen der durch Glucocorticoide induzierbare Transkriptionsfaktor GR, der Progesteron induzierbare Faktor PR (Tseng et al., 2001) und die durch Retinsäure induzierbaren Transkriptionsfaktoren des Nervensystems ROR α -1 und RAR. Darüber hinaus enthält die Promotorregion acht Bindestellen für den durch Serum induzierbaren Transkriptionsfaktor SRF.

Tab. 5.1: Potenzielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren im Promotor *sp* 83.5

Gewebe bzw. Zelltyp	Transkriptionsfaktor	Literatur
Neuronen und/oder Gliazellen	AP2	Baskin et al., 1997
	HEN1	Brown und Baer, 1994
	MyT1	Bellefroid et al., 1996
	N-Oct-3	Raynal et al., 1998
	N-Oct-2	Raynal et al., 1998
	Oct-6	He et al., 1991
	Olf1	Wang et al., 1993
	Pit1	Phillips, 2000
	RAR	Rowe et al., 1991
	ROR α alpha	Giguere et al., 1994
	Egr-2	Swirnoff und Milbrandt, 1995
	Ets1	Wasylyk et al., 1992
	Hlf	Falvey et al., 1995
	HNF3beta	Raynal et al., 1998
	CDP (Repressor)	Andres, 1994
	NRSF (Repressor)	Schoenherr et al., 1996
	DeltaEF1 (Repressor)	Sekido et al., 1994
Corpus striatum	IK2	Molnar und Georgopoulos, 1994
Corpus striatum	IK3	Molnar und Georgopoulos, 1994
Muskel- und Gehirnzellen	MEF2	Andres, 1995

Die computergestützte Analyse von Sequenzhomologien zu bekannten Transkriptionsfaktor-Bindestellen sind nur Hinweis auf eine mögliche Regulation des Promotors. Welche dieser potenziellen Bindestellen tatsächlich für die Aktivität des Promotors *sp* 83.5 funktionell relevant sind, lässt sich nur experimentell belegen. Jedoch weist die enorme Zahl an glia- und neuronspezifischen Transkriptionsfaktor-Bindestellen darauf hin, dass die Synthese der mRNA *sp* 83.5 in diesen Zelltypen spezifisch reguliert wird.

Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes ermöglicht nun die Untersuchung des Promotors *sp* 83.5 und damit die Identifizierung regulatorischer Sequenzelemente, die für eine gehirnspezifische Expression notwendig sind. Im Rahmen dieser Arbeit beschränkte sich die Promotoranalyse jedoch auf die funktionellen Kontrollelemente des Promotors *tmp* 83.5.

Die Nutzung alternativer Promotoren zur Bildung unterschiedlicher mRNA-Sequenzen von einem Gen beschränkt sich nicht auf das Gen 83.5. Dieses Phänomen wird in vielen Genen beobachtet, deren mRNAs in unterschiedlichen Zelltypen oder Geweben exprimiert werden. Beispielsweise werden bei dem AADC- (Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase) Gen ausgehend von zwei Promotoren eine neuronale (Katecholamin- und Serotonin-produzierende Neuronen) und eine nichtneuronale mRNA in Leber und Niere gebildet. Weitere Beispiele sind das Dystrophin-Gen, α -Tropomyosin, das Gastrin-releasing Peptid und das Tau-Gen (Albert et al., 1992 und Wagner, 1995). Die differentielle Expression wird durch die Bindung zellspezifischer Transkriptionsfaktoren an die unterschiedlichen Promotoren erzielt. Da auch von dem Gen 83.5 zwei Transkripte unter Nutzung unterschiedlicher Promotoren gebildet werden, könnte dies ein Hinweis auf eine differentielle Genexpression in verschiedenen Zelltypen des Gehirns sein. *In situ* Hybridisierungen unter Verwendung sequenzspezifischer Sonden für die mRNA *sp* 83.5 und *tmp* 83.5 wiesen daraufhin, dass die mRNA *sp* 83.5 in Gliazellen vorliegt (Oberthür, 2002).

5.3 Analyse der Promotorregion *tmp* 83.5 auf Elemente mit funktioneller Bedeutung für die Transkription

Der erste Schritt bei der Analyse des 4.607 bp langen Promotors *tmp* 83.5 auf regulatorisch relevante Regionen bestand in der Konstruktion einer Serie von Promotortestplasmiden, in denen der Wildtyppromotor im 5'-Bereich zunehmend verkürzt enthalten war. Neuronale und nicht-neuronale Zelllinien wurden mit den Testplasmiden transfiziert, um Promotorbereiche identifizieren und unterscheiden zu können, die eine funktionelle Bedeutung für eine ubiquitäre (nicht-zellspezifische) oder zellspezifische Expression des Gens haben.

Zur Konstruktion der Promotortestplasmide wurde der Vektor pGL-3 Basic (Punkt 3.1.12.2) verwendet. Dieser Basis-Vektor enthält selber keinen Promotor oder Enhancer. Er eignet sich daher, um beliebige, regulatorische Sequenzen aufzunehmen und auf ihre Fähigkeit zu testen, die Transkription eines Reportergens zu steuern. In den Promotortestplasmiden stand das Luciferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* unter der Kontrolle der inserierten *tmp* 83.5 Promotorvarianten. Dieses Gen eignet sich als Reportergen, da es in den transfizierten Zelllinien natürlicherweise nicht enthalten ist. Der Luciferase-Aktivitätstest ist sensitiv, einfach und schnell durchzuführen. Experimentell kann die Expressionshöhe des Reportergens durch die Messung der Lichtemission bestimmt werden, die bei der Umsetzung von Luciferin durch das Enzym Luciferase auftritt.

Damit beim Luciferaseaktivitätstest die gemessenen Expressionsunterschiede nur von den verschiedenen Promotordeletionen abhängen und nicht von trivialen Faktoren wie unterschiedliche Transfektionseffizienzen oder unterschiedliche Extraktpräparationen, wurde in allen Transfektionsexperimenten ein interner Standard einbezogen. Als interner Standard wurden die Zelllinien mit dem pRL-TK Reportergenvektor cotransfiziert (3.1.12.3). Das in diesem Vektor enthaltene Reportergen codiert für eine Luciferase aus der marinen Pflanze *Renilla reniformis*. Das Gen steht unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors. Aufgrund ihres unterschiedlichen evolutionären Ursprungs haben die beiden Luciferasen verschiedene Substraterfordernisse, so dass experimentell eine individuelle Messung der Aktivitäten dieser Enzyme in ein und demselben Zellextrakt möglich ist. Der Kontrollvektor wurde im 10fachen Überschuss im Vergleich zu den Promotortestplasmiden eingesetzt, um trans-Effekte des Kontrollvektors auf das Testplasmid auszuschließen.

Das 3'-Ende der verschiedenen Promotorfragmente in den Testplasmiden war identisch (24 bp stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes). Die einzelnen Promotortestplasmide erhielten die Bezeichnung pProm mit Angabe der Länge des Promotor-Fragmentes (in bp).

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Promotortestplasmiden wurden zwei weitere konstruiert, die im 3'-Bereich des *timp 83.5*-Promotors den gesamten Sequenzbereich vom Transkriptionsstartpunkt bis zum Translationsstartcodon (die sogenannte 5'-nicht-translatierte Region = 5'-UTR) enthielten. In einem Vektor war der gesamte Wildtyp-Promotor enthalten (pProm 4.350/UTR), im anderen Testplasmid nur der basale Promotor, der im 5'-Bereich 78 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes endet (pProm 100/UTR). Der Vergleich dieser Konstrukte mit denjenigen ohne 5'-UTR (pProm 4.350 und pProm 100) sollte zeigen, ob sich auch in dieser Region funktionelle Elemente der Transkription befinden. Die Promotortestplasmide sind im Abschnitt 4.5.3 in der Abbildung 4.19 schematisch dargestellt.

Zur Identifizierung regulatorischer cis-Elemente, die für die korrekte zeitliche und räumliche neuronale bzw. gehirnspezifische Expression verantwortlich sind, wurden neuronale und nicht-neuronale Zelllinien mit den Promotortestplasmiden transfiziert. Als neuronale Zelllinien wurden die humane Zelllinie SK-N-SH und die murine Zelllinie Neuro-2a eingesetzt. Ursprünglich sollte auch die Phäochromocytom-Zelllinie PC-12 zur Transfektion eingesetzt werden, die nach Behandlung mit dem Nervenwachstumsfaktor NFG zu sympathischen Neuronen differenzieren. Eine ausdifferenzierte Zelllinie hätte im Vergleich zu den Neuroblastomazelllinien, die in unterschiedlichen Stadien der neuronalen Differenzierung arretiert sind, andere regulatorische Eigenschaften. Jedoch ließen sich diese Zellen nur sehr ineffizient transfizieren. Die Messwerte der Expressionsaktivität des

Reportergens lagen im Bereich der unteren Messgrenze des Luminometers, so dass diese Zelllinie für die Untersuchung der Promotoraktivitäten nicht eingesetzt werden konnte.

Als nichtneuronale Zelllinie wurde die Nierenfibroblastenzelllinie BHK 21 verwendet.

Der Vergleich der Expressionshöhe des Reportergens in beiden Zelltypen ermöglicht die Identifizierung von Regionen mit neuronal-spezifischen Promotorelementen. Ist durch eine Deletion ein zellspezifischer funktioneller Bereich im Promotor weggefallen, tritt eine Veränderung der Expressionshöhe nur in der neuronalen Zelllinie auf, nicht aber in der nichtneuronalen Zelllinie. Treten Effekte sowohl in der neuronalen als auch in der nichtneuronalen Zelllinie auf, handelt es sich in diesem Fall um nicht-zellspezifische Elemente innerhalb der deletierten Region im eingesetzten Promotortestplasmid.

Nur größere Veränderungen der Expressionsrate des Reportergens (mindestens Faktor 2 im Vergleich zur vorhergehenden Deletion oder Wildtyp) wurden als signifikanter Hinweis für die Deletion eines funktionellen Elementes gewertet. Erfahrungsgemäß können kleinere Unterschiede häufig nicht darauf zurückzuführen werden (Carey und Smale, 1999).

5.3.1 Deletionsstudie in der Zelllinie Neuro-2a

In der murinen Neuroblastomazelllinie Neuro-2a ermöglichte der basale Promotorbereich (Position -59 bis +24 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) noch eine transiente Expressionsrate, die 74 % der Expressionshöhe des Wildtyppromotors entsprach (siehe Abb. 4.22). Dieser Bereich ist demnach für die Ausbildung des basalen Transkriptionskomplexes ausreichend.

Die sequenzielle Deletion des Wildtyppromotors gab Hinweise darauf, dass in mindestens drei Promotorbereichen reprimierende Elemente enthalten sind. Die Deletion dieser Promotorregionen erhöhte die Expressionsrate in der murinen Zelllinie um das 2 bis 2,5fache (Promotorbereiche B, D und K; siehe Abb. 5.1, Teilabbildung A).

Ein signifikant aktivierendes Element kann innerhalb des Promotorbereichs von -477 bis -234 vermutet werden. Die Deletion dieses Bereichs führte zu einer Reduktion der Expressionsrate um nahezu 80 % (siehe Abb. 5.1, Teilabbildung A, Prom H).

Weitere vier Bereiche zeigten einen deutlichen Einfluss auf die Expressionshöhe, erreichten jedoch nicht ganz eine Verdopplung bzw. Halbierung der Expressionsraten (siehe Abb. 5.1, Teilabbildung A, Prom A, Prom E, Prom F, Prom G). Diese Veränderungen werden daher im Vergleich zu den oben beschriebenen Promotorregionen

nach Carey und Smale (2000) als nicht gleichermaßen signifikant eingestuft. Diese Promotorbereiche müssen in weiteren Arbeiten z.B. durch kleinstufigere Deletionen näher untersucht werden. Schließlich ist es möglich, dass in den betreffenden Bereichen sowohl aktivierende als auch reprimierende Elemente liegen, so dass die gesamte Deletion dieser Region in der Bilanz nur geringfügige Expressionsveränderungen hervorrufen. Diese Einschränkung gilt gleichermaßen für alle Bereiche, in denen keine oder nur sehr kleine Veränderungen der Expressionsraten nach Deletion aufgetreten sind. Die Methode der sequenziellen Deletion hat generell die Einschränkung, zwar bei beobachteten starken Expressionsveränderungen Hinweise auf funktionelle Elemente geben zu können, kann jedoch umgekehrt funktionelle Elemente in deletierten Regionen ohne signifikante Expressionsveränderungen nicht ausschließen.

Eine drastische Erhöhung der Expressionsrate konnte beobachtet werden, wenn zusätzlich die 5'-nichttranslatierten Region in Promotortestplasmiden enthalten war (siehe Abb. 5.2). Das Promotortestplasmid mit dem Promotorwildtyp pProm 4350/UTR enthielt den gesamten Promotor und die 5'-UTR von Position -4.321 bis +994, das Testplasmid pProm 4.350 nur den Bereich von -4.321 bis +24. Entsprechend enthielt das Testplasmid mit basalen Promotor pProm 100/UTR den Sequenzbereich von -78 bis +805, pProm 100 nur die Promotorregion von -78 bis +24.

Die Expression des Promotorwildtyps erhöhte sich mit der 5'-UTR um mehr als den Faktor 7. Der basale Promotor wurde mit der 5'-UTR ca. 40fach stärker. Diese signifikanten Aktivitätssteigerungen lassen auf ein stark aktivierendes Promotorelement, z.B. einen Enhancer, in der 5'-UTR schließen.

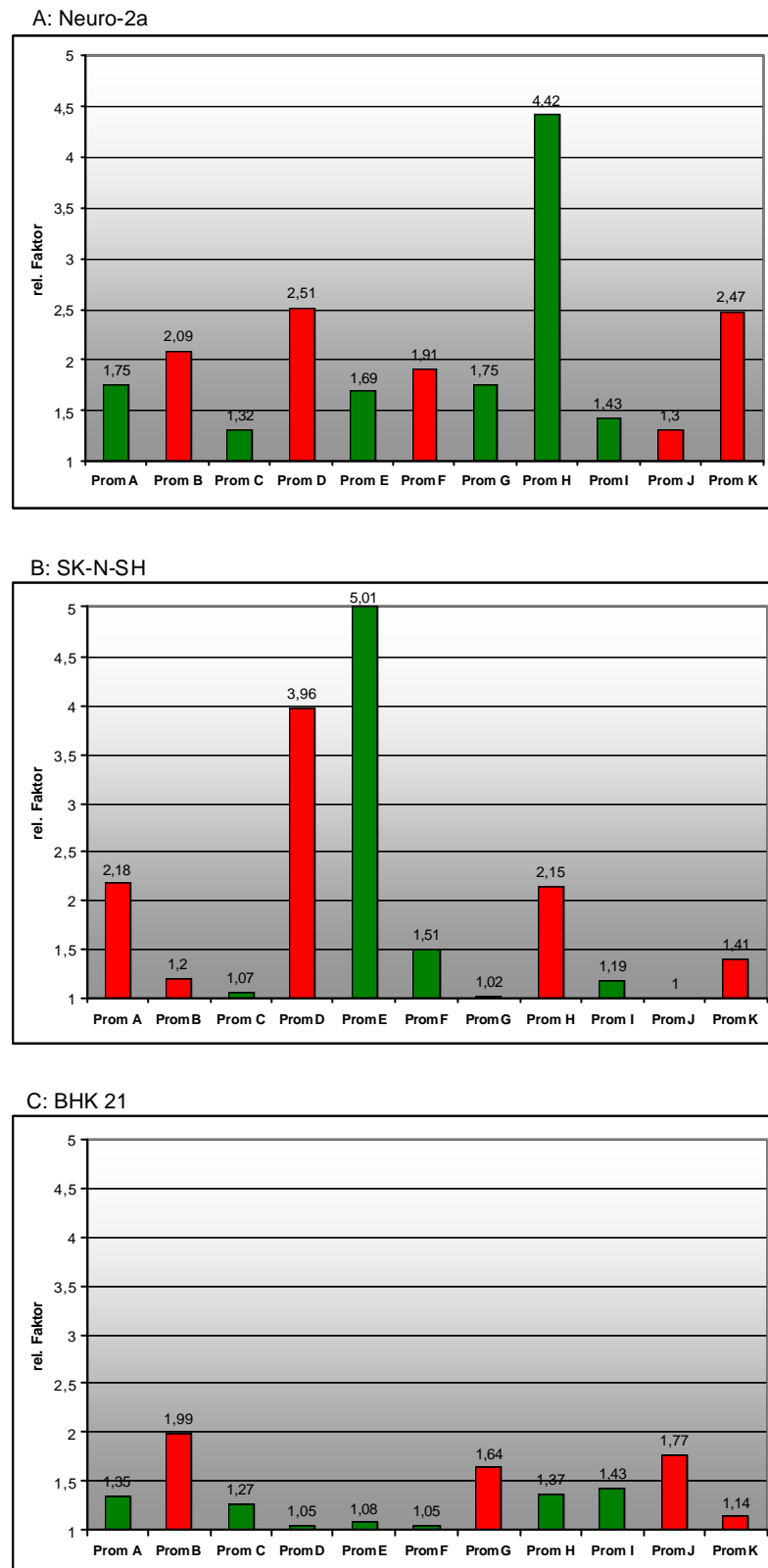


Abb. 5.1: Einfluss der sequenziellen Deletionen im *tmp 83.5* Promotor

Änderungen der relativen Luciferase-Aktivitäten der Promotortestplasmide in Abhängigkeit von den sukzessiven Deletionen in den Zelllinien (A) Neuro-2a, (B) SK-N-SH und (C) BHK 21. Dargestellt ist die relative Erhöhung (rot) oder Erniedrigung (grün) der Luciferase-Aktivität gegenüber der vorangegangenen Deletion. **Deletionsreihe des Wildtyppromotors:** Prom A (4.321 bis -2.053); Prom B (zusätzlich -2.053 bis -1.681); Prom C (zusätzlich -1.681 bis -1.327); Prom D (zusätzlich -1.327 bis -945); Prom E (zusätzlich -945 bis -745); Prom F (zusätzlich -745 bis -564); Prom G (zusätzlich -564 bis -477); Prom H

(zusätzlich –477 bis –234); Prom I (zusätzlich –234 bis –140); Prom J (zusätzlich –140 bis –78); Prom K (zusätzlich –78 bis –59).

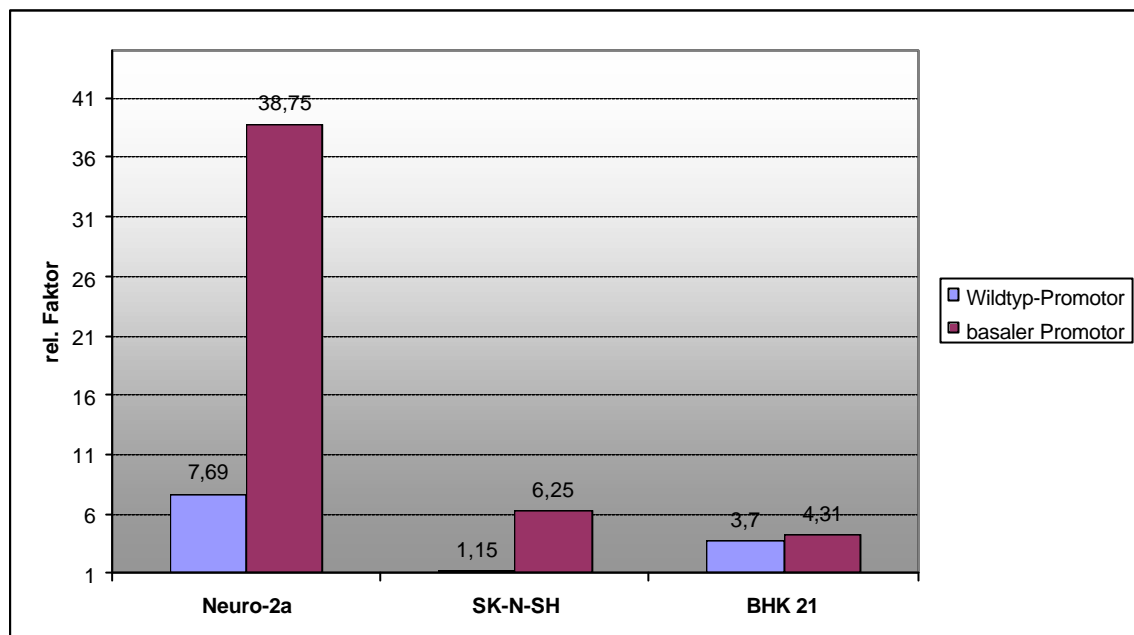


Abb. 5.2: Expressionserhöhung, wenn im *tmp 83.5* Promotor zusätzlich die 5'-UTR enthalten ist. Dargestellt ist die Erhöhung der Expression des Reportergens beim Wildtyppromotor (blaue Balken) sowie basalen Promotorbereich (rote Balken). Untersucht wurde der Einfluss der 5'-UTR in den Zelllinien Neuro-2a, SK-N-SH und BHK 21. **Promotortestplasmide:** Wildtyppromotor pProm 4.350/UTR (mit 5'-UTR) und pProm 4.350 (ohne 5'-UTR); **Basaler Promotor:** pProm 100/UTR (mit 5'-UTR) und pProm 100 (ohne 5'-UTR). Weitere Einzelheiten siehe Text.

5.3.2 Deletionsstudie in der Zelllinie SK-N-SH

In der humanen Neuroblastomazelllinie SK-N-SH ermöglichte der basale Promotorbereich (Position –59 bis +24 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) eine transiente Expressionsrate, die 328 % der Expressionshöhe des Wildtyppromotors entsprach (siehe Abb. 4.24). Dieser Bereich ist demnach für die Ausbildung des basalen Transkriptionskomplexes in der untersuchten Zelllinie ausreichend. Zugleich zeigt dies, dass unter den gegebenen Bedingungen zumindest ein reprimierendes Element im Promotor enthalten sein muss und die basale Aktivität des Promotors reduziert.

Die sequenzielle Deletion des Wildtyppromotors gab Hinweise darauf, dass in mindestens drei Promotorbereichen reprimierende Elemente enthalten sind (siehe Abb. 5.1, Teilabbildung B). Die Deletion dieser Promotorregionen erhöhte die Expressionsrate in der murinen Zelllinie um das 2 bis 4fache. Es handelt sich um die Promotorbereiche A (–4.321 bis –2.053), D (–1.327 bis –945) und H (–477 bis –234).

Ein stark aktivierendes Element kann innerhalb des Promotorbereichs –975 bis –745 (Prom E) vermutet werden (siehe Abb. 5.1, Teilabbildung B). Die Deletion dieses Bereichs führte zu einer Reduktion der Expressionsrate um 80 %.

Die beiden mit Abstand stärksten Effekte konnten bei Deletion der Bereiche Prom E und Prom D beobachtet werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass im Promotor ein stark reprimierendes und ein stark aktivierendes Element in unmittelbarer Nachbarschaft auftreten. Unter Umständen könnte diese Nachbarschaft einen Hinweis auf den Regulationsmechanismus geben. Es ist bekannt, dass manche Transkriptionsfaktoren kompetitiv an überlappende Bindestellen binden (Carey und Smale, 2000). Weitere Untersuchungen sind hierzu notwendig.

Die anderen untersuchten Bereiche zeigten einen deutlich geringeren Einfluss auf die Expression des Reportergens im Promortestplasmid. Wie schon im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, müssen diese Promotorbereiche durch kleinstufigere Deletionen noch näher untersucht werden, um hier noch weitere funktionelle Elemente zu identifizieren oder auszuschließen.

Eine signifikante Erhöhung der Expressionsrate ergab sich wie in der Neuro-2a Zelllinie mit der 5'-nichttranslatierten Region in dem Promortestplasmid pProm 100/UTR im Vergleich zum pProm 100 (siehe Abb. 5.2). Die relative Luciferase-Aktivität erhöhte sich mit der 5'-UTR um das 7,3fache. Diese drastische Erhöhung der Expressionsrate weist auch hier auf ein stark aktivierendes Promotorelement hin. Die 5'-nichttranslatierte Region zeigte hingegen keinen entscheidenden Effekt auf den Wildtyp-Promotor pProm 4.350, die relative Luciferase-Aktivität erhöhte sich hier lediglich um 15 Prozent. Das dieser Sequenzbereich im Wildtyp-Promotor nur einen geringen Einfluss zeigt, kann daran liegen, dass im Sequenzbereich –4.321 bis –2.053 ein reprimierend wirkendes Element liegt, das die Wirkung des Aktivators im 5'-nichttranslatierten Bereich aufhebt. In der Zelllinie Neuro-2a hatte der gleiche Bereich einen positiven Einfluss auf die Expression ausgeübt.

5.3.3 Vergleich der Expressionsmuster in den untersuchten neuronalen Zelllinien

Vergleicht man die Deletionsstudien in den neuronalen Zelllinien Neuro-2a und SK-N-SH miteinander, so werden die aktivierend wirkenden Elemente zwischen den Sequenzbereichen –945 bis –745 (Prom E) (siehe Abb. 5.1, Teilabbildungen A und B) und in der 5'-nichttranslatierten Region bestätigt (Abb. 5.2). Diese führen in beiden Zelllinien zu einer stark erhöhten Promotoraktivität. Jedoch hatte die 5'-UTR nur einen geringen Effekt auf die Expressionsrate des Wildtyp-Promotors pProm 4.350 in der Zelllinie

SK-N-SH. Eine mögliche Ursache könnte die Wirkung eines starken Repressors in dem Sequenzbereich -4.321 bis -2.053 sein, der nur in der Zelllinie SK-N-SH exprimiert wird bzw. aktiv ist, und die Wirkung des starken Aktivators in der 5'-UTR aufhebt.

Eine signifikante Reduktion der Promotoraktivität in beiden Zelllinien war zwischen dem Sequenzbereich -1.327 bis -945 (Prom D, siehe Abb. 5.1) zu beobachten.

Hingegen zeigten sich bei anderen Promotorbereichen gegenläufige Effekte auf die Expressionsrate (Prom F und Prom H, siehe Abb. 5.1). In der Zelllinie SK-N-SH könnte der Sequenzbereiche Prom F Bindestellen für aktivierend wirkende Faktoren enthalten, wohingegen in der Zelllinie Neuro-2a dieser Bereich eine reprimierende Wirkung vermittelte. Beide Effekte waren jedoch nur schwach ausgeprägt (Änderungsfaktor der Expressionshöhe < 2) und sind daher nicht unbedingt ein guter Hinweis für eine entsprechende Funktionalität dieser Bereiche.

Die Deletion des Promotorbereich -477 bis -234 (Prom H, siehe Abb. 5.1) führte in der Zelllinie SK-N-SH zu einer signifikanten Erhöhung und in der Zelllinie Neuro-2a zu einer signifikanten Erniedrigung der Expressionsrate. Die Unterschiede zwischen den beobachteten Effekten der einzelnen Promotorregionen können durch die unterschiedliche Abstammung der Zellen begründet werden. Neuro-2a ist eine murine Neuroblastomazelllinie, SK-N-SH eine humane Neuroblastomazelllinie. Diese Neuroblastoma-Zelllinien sind zudem auf unterschiedlichen Stufen der neuronalen Differenzierung arretiert.

5.3.4 Deletionsstudie in der Zelllinie BHK 21

Die sequenzielle Deletionsstudie des Promotors *tmp* 83.5 in der Nierenfibroblastenzelllinie BHK 21 zeigte, dass der Kernpromotor pProm 80 (Sequenzbereich –59 bis +24) die höchste Expressionsrate aufweist (siehe Abb. 4.22). Im Vergleich zum Wildtyp-Promotor pProm 4.350 ist sie um das 2,6fache erhöht. Der Promotor steht also in dieser Zelllinie unter einem insgesamt reprimierenden Einfluss. Die höchsten Aktivitätsänderungen ergaben sich durch Wegfall der Sequenzbereiche –2.053 bis –1.681 (Prom B), –564 bis –477 (Prom G) sowie –140 bis –78 (Prom J) (siehe Abb. 5.1, Teilabbildung C). Die Deletion dieser Bereiche führte zu einer 1,6 bis 2fachen Erhöhung der Expressionsrate. In diesen Sequenzbereichen befinden sich demnach Bindestellen für reprimierend wirkende Faktoren. Kontrollelemente, die einen signifikant positiven Effekt auf die Transkriptionsaktivität in der Promotorregion –4.321 bis –59 ausüben könnten, sind in dieser Zelllinie nicht aktiv.

5.3.5 Vergleich der Deletionsstudien in den untersuchten Zelllinien

Ein Vergleich der Promotoraktivitäten zu den neuronalen Zelllinien zeigte, dass ein reprimierend wirkendes Element im Sequenzbereich –2.053 bis –1.681 (Prom B) auch in der Zelllinie Neuro-2a auftrat, dessen Deletion zu einer 2fachen Erhöhung der Promotoraktivität führte. Demnach könnte es sich um einen Repressor handeln, der nicht zellspezifisch wirkt. Der Bereich –564 bis –477 (Prom G) weist hingegen ein aktivierendes Element in der Neuro-2a Zelllinie auf, in der BHK-Zelllinie vermittelte dieser Bereich eine geringe reprimierende Wirkung. Die Deletion des Promotorabschnittes ergab eine 1,8fache Reduktion der Expressionsrate und hatte in der Zelllinie SK-N-SH keinen Effekt.

Insgesamt haben alle untersuchten Deletionen nur einen im Vergleich zu den Untersuchungen in den neuronalen Zelllinien geringen Einfluss auf die Expressionsrate des Reportergens. Fast alle beobachteten Expressionsunterschiede in Folge von Deletionen lagen unter dem Faktor 1,5. Eine signifikante Regulation des Promotors ist daher in dieser nicht-neuronalen Zelllinie nicht zu beobachten.

Eine signifikante Erhöhung der Expressionsrate ergab sich jedoch wie in der Neuro-2a und SK-N-SH Zelllinie mit der 5'-nichttranslatierten Region in dem Promotortestplasmid pProm 100/UTR (Sequenzbereich –79 bis +805) im Vergleich zum pProm 100 (siehe Abb. 5.2). Die relative Luciferase-Aktivität zeigt eine 4,3fache Erhöhung. Die 5'-nichttranslatierte Region zeigte auch einen entscheidenden Effekt auf die Expressionsstärke des Wildtyp-Promotor pProm 4.350. Die Promotoraktivität erhöhte sich

um das 3,7fache. Diese deutliche Erhöhung der Expressionsrate weist auch hier auf ein stark aktivierendes Promotorelement (Enhancer?) hin, der nicht zellspezifisch wirkt.

Die Expressionsstudien mit den deletierten Promotorvarianten in den verschiedenen Zelllinien zeigten, dass mindestens zwei neuronal-zellspezifische Elemente im Promotor *tmp 83.5* enthalten sein müssen. Diese liegen in den Sequenzbereichen Prom D (-1327 bis -945) und Prom E (-945 bis -745). Beim ersten handelt es sich um ein reprimierendes Element, das zweite wirkt stimulierend auf die Expressionsrate. Mögliche Interaktionen zwischen diesen benachbarten Elementen sind ein mögliches Ziel für weiterführende Untersuchungen. Die betrachteten Sequenzabschnitte hatten keinen Einfluss auf die Expression in der nicht-neuronalen Nierenfibroblastenzelllinie BHK 12.

Ein anderer starker Effekt bei Deletion des Abschnitts Prom H (-477 bis -234) in der murinen neuronalen Zelllinie Neuro-2a deutet auch auf ein neuronal-spezifisches Element hin. In BHK 21-Zellen konnte kein signifikanter Einfluss dieses Abschnittes auf die Expression gefunden werden. Jedoch war auch der Effekt in der anderen untersuchten neuronalen Zelllinie SK-N-SH nicht gleich stark ausgeprägt und zudem nicht aktivierend, sondern reprimierend.

Hinweise auf funktionelle Elemente innerhalb von Promotoren können Sequenzhomologie-Vergleiche der 5'-Bereiche von homologen oder gleichartig regulierten (koregulierten) Genen geben (Punt et al., 1991). Funktionelle Elemente sind in der Regel konservierte Bereiche innerhalb dieser Promotoren.

Ein homologes Gen zu 83.5 wurde durch Sequenzabgleich in Nukleinsäuredatenbanken gefunden. Es handelt sich um das humane Gen HTMP10, das auf dem Chromosom 10 in der Region q24 lokalisiert ist (siehe Abschnitt 4.4.2, Nobile et al., 2002). HTMP10 hat sowohl im codierenden und nichtcodierenden Bereich signifikante Sequenzhomologien (siehe Abschnitt 4.4.3). Darüber hinaus scheint auch die genomische Organisation des humanen und des porcinen Gens konserviert zu sein. Das Initiations-Codon ist in beiden Fällen das letzte Nukleotid-Triplett des Exons 1. Die Exon-Intron Grenzen sind an identischen Positionen, so dass die Exons identische Größen aufweisen. Ausnahme bilden hier nur das Exon 3, das im humanen Gen drei Basenpaare kürzer ist und das Exon 6, das beträchtlich länger ist (HTMP10: 2.897, Gen 83.5: 1.816).

Jedoch wurden für das Gen HTMP10 bisher weder der Transkriptionsstartpunkt bestimmt noch die Promotorregion näher untersucht, so dass keine Zuordnung funktioneller Promotorelemente getroffen werden kann. Ein Sequenzvergleich mit dem mutmaßlichen Promotorbereich konnte keine signifikanten konservierten Elemente identifizieren.

Weiterhin konnte das Gen 83.5 mittels Homologievergleiche bisher keiner Genfamilie zugeordnet werden.

5.4 Untersuchung des Promotors *tmp* 83.5 auf Sequenzhomologien zu bekannten Repressoren der Transkription

Die Expressionsstudien mit den Promotortestplasmiden in den Zelllinien Neuro-2a, SK-N-SH und BHK 21 identifizierten insgesamt acht Sequenzbereiche (-4.321 bis -2.053, -2.053 bis -1.681, -1.327 bis -945, -745 bis -564, -564 bis -477, -477 bis -234, -140 bis -78 und -78 bis -59) in denen Bindestellen für Repressoren liegen könnten. Zur Identifizierung bereits bekannter Repressoren im Promotor *tmp* 83.5 wurde mit dem Programm MatInspector professional (Genomatix GmbH, Frech et al., 1997) die entsprechenden Regionen nach Sequenzhomologien zu bekannten Repressor-Bindestellen untersucht. Die Parameter des Programms wurden so eingestellt, dass eine Homologie zur Kernsequenz der Bindestelle von mindestens 70 % bestehen musste, um erkannt zu werden. In der Tabelle 5.2 sind die gefundenen mutmaßlichen Bindestellen für Repressoren aufgeführt.

Tab. 5.2: Potenzielle Bindestellen für Repressoren

Promotorbereich	Repressor	Homologie	Position	DNA-Strang	Sequenz
-2.053 bis -1.681	TCF11/MafG	78 %	-1978	codierend	gcaaaaaTGATttaacactgca
	TCF11/MafG	100 %	-1856	nichtcodierend	acaaacTGACacatcaagcatc
-1.327 bis -945	CDP	100 %	-1259	codierend	caccacagtttATGG
	COUP	84 %	-1246	codierend	gGATCtttgaccca
-745 bis -564	NRSF	75 %	-691	codierend	ttcATCAccaagcccaggaca
	CDP	100 %	-590	nichtcodierend	ccAATAatttgg
-564 bis -477	CHOP	100 %	-550	codierend	gacTGCAattcct
	E4BP4	100 %	-505	nichtcodierend	ctaTAAAgtaaataa
-140 bis -78	-----				
-78 bis -59	-----				

Die Deletion der Promotorregion -2.053 bis -1.681 (Prom B, vgl. Abb. 5.1) führte in der Zelllinie BHK 21 und Neuro-2a zu einer Erhöhung der Promotoraktivität. Dies deutet auf eine nichtzellspezifische Bindestelle für einen Repressor hin. In dieser Region wurden zwei Bindestellen für das Heterodimer TCF11/MafG gefunden. Beide Faktoren gehören zur Gruppe der bZIP-Faktoren, die über Leucin-Zipper-Strukturen homo- oder heterodimerisieren. MafG bindet als Homodimer an die AP-1 Erkennungssequenz und reprimiert die Transkription. Das Homodimer TCF11 hingegen ist ein Transaktivator. Durch die Heterodimerisierung mit MafG wird die Transaktivierungsdomäne von TCF11 maskiert und nach Bindung an die Erkennungssequenz (5'-TGCTgaGTCAT-3') die Transkription reprimiert (Johnsen et al., 1998). TCF11 hat in Form des Heterodimers eine

höhere Affinität zur DNA. Beide Faktoren werden in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert, so dass dieses Heterodimer auch ein möglicher Repressor des Promotors *tmp 83.5* darstellen könnte.

Der COUP Transkriptionsfaktor (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor) gehört zur Super-Familie der Orphan-Rezeptoren und inhibiert durch Bindung an das Hormon-Rezeptor-Element die durch Retinsäure-Rezeptoren vermittelte Transkriptionsaktivierung (Kliwer et al., 1992). Eine wichtige Rolle wird COUP in der Entwicklung und Organogenese zugeschrieben, wo er ebenfalls Repressorfunktion besitzt. COUP wird neben Leber und Darm im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert. In dem Promotorbereich -1.327 bis -945 (Prom D, siehe Abb. 5.1) liegt in beiden neuronalen Zelllinien eine Bindestelle für einen, nach den vorliegenden Ergebnissen neuronspezifisch reprimierend wirkenden Faktor vor, so dass eine Repressorfunktion für COUP in diesem Bereich möglich erscheint.

CDP (CCAAT displacement protein) spielt eine wichtige Rolle in diversen Differenzierungsprogrammen von Vorläuferzellen. In adulten Zellen wird die Expression von CDP herabgesetzt (Andres et al., 1994). Eine gewebespezifische Repressorfunktion von CDP im Promotor *tmp 83.5* ist denkbar, denn ein negativ wirkendes Kontrollelement wurde in den Zelllinie Neuro-2a und SK-N-SH im Bereich -1.327 bis -945 (Prom D, siehe Abb. 5.1) beobachtet, aber nicht in der differenzierten Zelllinie BHK 21. Das gleiche gilt für die Region -745 bis -564 (Prom F, siehe Abb. 5.1) in der ebenfalls eine Bindestelle für CDP vorhanden ist. In diesem Bereich wurde ein reprimierendes Element nur in der Zelllinie Neuro-2a gefunden.

CHOP gehört zur Familie der C/EBP Transkriptionsfaktoren mit basischem Leucin-Zipper (siehe 2.4.1) und wird in differenzierten Fibroblasten exprimiert. In neuronalen Zellen konnte CHOP nicht nachgewiesen werden. CHOP wirkt als Repressor, indem er nach Dimerisierung mit C/EBP-Proteinen an die DNA-Erkennungssequenz dieser Faktoren bindet (Ron und Habener, 1992). Eine CHOP Bindestelle liegt im Sequenzbereich -564 bis -477 (Prom G, siehe Abb. 5.1). Nur in der Zelllinie BHK 21 wurde eine entsprechende Erhöhung der Expressionsrate nach Deletion dieses Bereiches nachgewiesen. CHOP kann demnach als nicht-neuronal-spezifischer Repressor im Promotor *tmp 83.5* aktiv sein.

E4BP4 ist Mitglied der CREB-Familie von bZIP Transkriptionsfaktoren und wirkt als Antagonist der cyclischen AMP-vermittelten Transkription in Neuronen (Abschnitt 2.5.3.1, Cowell et al., 1992). Eine Repressorfunktion von E4BP4 in dem Promotorbereich -564 bis -477 (Prom G, Abb. 5.1), welche nur in der BHK 21 Zelllinie beobachtet wurde, ist demnach auszuschließen.

NRSF (Neuron-Restrictive-Silencer-Faktor, siehe 2.5.1) ist ein starker Repressor, der die Transkription neuronaler Gene mit funktioneller NRSE-Bindestelle in nichtneuronalen Zellen und in neuronalen Vorläuferzellen reprimiert. Dieser Transkriptionsfaktor verhindert die Expression neuronaler Gene außerhalb des Nervensystems. In neuronalen Zellen wirkt er sowohl als Aktivator als auch Repressor. Die jeweilige Funktion ist abhängig von der Lage der Bindestelle im Promotor. Liegt sie stromabwärts in der 5'-nichttranslatierten Region oder weniger als 50 bp stromaufwärts der TATA-Box, wird die Transkription in neuronalen Zellen aktiviert. Ist sie hingegen mehr als 50 bp stromaufwärts von der TATA-Box lokalisiert, wird die Transkription reprimiert (Bessis et al., 1997; Ogbourne und Antalis, 1998). Das NRS-Element liegt in dem Promotorbereich –745 bis –564 (Prom F, siehe Abb. 5.1), der nur in der Zelllinie Neuro-2a eine reprimierende Wirkung zeigte. Eine Repressorfunktion von NRSF ist in diesem Promotorbereich denkbar.

Eine reprimierende Wirkung wurde in dem Bereich –140 bis –78 (Prom J, Abb. 5.1) in der Zelllinie BHK 21 beobachtet und in dem Sequenzbereich –78 bis –59 (Prom K) in der Zelllinien SK-N-SH und Neuro-2a. Jedoch liegen in beiden Promotorregionen keine Sequenzelemente für bekannte Repressoren.

Diese Untersuchungen auf bekannte Sequenzelemente für Repressoren der Transkription liefern nur Hinweise auf eine mögliche Funktion des entsprechenden Faktors bei der Regulation der Transkription. Zum einen sind im Vergleich zu Aktivatoren bisher nur wenige Repressoren der Transkription bekannt und zum anderen wirken die wenigsten über einen direkten Repressionsmechanismus (2.4.3). Der gebräuchlichste Mechanismus ist die indirekte Repression. Indirekt wirkende Repressoren heben die Wirkung von Aktivatoren auf, indem sie die DNA-Bindung von Aktivatoren verhindern oder die Wechselwirkung mit dem basalen Initiationskomplex aufheben. Hinzu kommen noch Transkriptionsfaktoren, die in Abhängigkeit vom Promotorkontext sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken können. Des weiteren sind noch die Corepressoren zu erwähnen, die über Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen regulatorischen Transkriptionsfaktoren und den allgemeinen Transkriptionsfaktoren des RNA Polymerase II Holoenzym die Initiation der Transkription inhibieren (Hanna-Rose und Hansen, 1996).

5.5 Untersuchung des Promotors *tmp* 83.5 auf bekannte Promotor-Module

Sequenzelemente wie Enhancer und Silencer sind starke funktionelle Module, die mindestens zwei Bindestellen für Transkriptionsfaktoren enthalten und in einer definierten Reihenfolge und Abstand zueinander innerhalb dieser Region angeordnet sind.

Im Gegensatz zu isolierten Bindestellen wirken diese synergistisch oder antagonistisch. In synergistischen Modulen wirken zwei Transkriptionsfaktoren mit eng benachbarter Bindestelle gleichzeitig, was zu einer hohen Transkriptionsaktivierung führt. Die Wechselwirkung zwischen den Faktoren ist entweder direkt oder wird über Cofaktoren vermittelt. Die Proteine treten mit verschiedenen Komponenten des basalen Transkriptionskomplexes zur Aktivierung in Wechselwirkung. Innerhalb antagonistischer Promotormodule beeinträchtigen sich zwei Transkriptionsfaktoren gegenseitig negativ.

Promotormodule, die aus zwei Sequenzelementen bestehen, werden in fünf Gruppen eingeteilt (Kel et al., 1997):

- a) gewebespezifische Module werden von einem gewebe- oder zelltypspezifisch und einem ubiquitär und konstitutiv wirkenden Faktor gebunden,
- b) gewebespezifische induzierbare Module. Hier bindet ein gewebespezifischer und ein ubiquitärer, aber induzierbarer Faktor,
- c) induzierbare Module. Ein Faktor vermittelt die Antwort auf ein extrazelluläres Signal und der andere ist ubiquitär und konstitutiv,
- d) Module, die Signaltransduktionskaskaden verbinden. Diese werden von Faktoren gebunden, die über verschiedene Signalwege induziert werden,
- e) Zell-Zyklus-abhängige Module; hier ist die Aktivität des ersten Faktors vom Stadium des Zell-Zyklus abhängig und der zweite Faktor Zell-Zyklus unabhängig.

Zur Identifizierung potenzieller Module im Promotor *tmp* 83.5 und in der 5'-nichttranslatierten Region wurde mit dem Programm ModelInspector professional (Genomatix GmbH, Frech et al., 1997) der Promotorbereich von Position -4.321 bis +590 nach Sequenzhomologien bereits bekannter Promotor-Module untersucht. Es wurden in diesem Sequenzbereich 13 Module mit hoher Spezifität gefunden. Ein Vergleich der Promotoraktivitäten der Testplasmide mit den Positionen der Module zeigte, dass drei der Module mögliche Regulationseinheiten des Promotors *tmp* 83.5 darstellen (Tab. 5.3).

Tab. 5.3: Pomotormodule innerhalb des Promotors *tmp 83.5* einschließlich der 5'-UTR

Angegeben ist die Bezeichnung des Moduls, die bindenden Transkriptionsfaktoren, ihre Position innerhalb der Promotorregion, die Kernsequenz der Protein-Bindestellen und der Abstand der Bindestellen im Modul zueinander.

Modul	Transkriptionsfaktoren	Position	Strang	Sequenz der Bindestellen	Homologie	Abstand der Elemente
GREF-MYOF	GR NF1	-762 -751	(+) (+)	ACTCCGATTTTCACTTGTCTGATGGC TGATGGCTGTTGGTCTGC	84,3 %	20 bp
GREF-CEBP	GR C/EBPbeta	-762 -789	(+) (-)	ACTCCGATTTTCACTTGTCTGATGGC TCGTGGTGCAGTGG	78,2 %	32 bp
CREB-NFAT	ATF NFAT	-237 -209	(+) (-)	ATGACGTTTTTG GACAGGAAAGGG	64 %	15 bp
EGR-NFAT	Egr-2 NFAT	-192 -209	(+) (-)	TGGTGTAGGCCA CACAGGAAAGCG	83,5 %	16 bp
NFκB-CREB	c-REL HLF	+349 +344	(+) (+)	GGGGCCTTCC GTTAGATGAC	87,6 %	12 bp

Module GREF-MYOF / GREF-CEBP

Die Promotoraktivitäten in der Zelllinie SK-N-SH reduzieren sich nach Deletion des Sequenzbereiches -945 bis -745 (Prom E, siehe Abb. 5.1) um das 5fache. In der Zelllinie Neuro-2a nimmt unter den gleichen Bedingungen die Expression um das 1,7fache ab. Demnach liegt in dieser Promotorregion ein aktivierendes Element. Innerhalb dieses Bereiches wurden durch Homologievergleich zwei regulatorische Module mit der Bezeichnung GREF-CEBP und GREF-MYOF gefunden (Tab. 5.3).

Das erste Modul trägt Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren C/EBPbeta (Position -795 bis -782) und GR (Position -750 bis -776). Das zweite Modul GREF-MYOF enthält die Bindestellen für den Transkriptionsfaktor GR (Position -750 bis -776) und NF-1. Die GRE Bindestelle ist somit in beiden Modulen enthalten und bildet das zentrale Sequenzelement beider Module. Die NF-1 Bindestelle des Moduls GREF-MYOF erstreckt sich von Position -739 bis -755 und liegt zur Hälfte am 5'-Ende des pProm 770 (-745). Wird die Promotorregion -945 bis -745 deletiert, so ist die Kernsequenz dieser Bindestelle (5'-TTGGTC-3') nicht mehr in dem Promotorkonstrukt pProm 770 vorhanden und der Transkriptionsfaktor NF-1 kann nicht mehr an die Sequenz im pProm 770 binden. Beide Module sind deshalb nur im Promotorfragment pProm 980 aktiv, was gut mit der Abnahme der Promotoraktivität im pProm 770 (nach Deletion des Abschnittes Prom E) korreliert.

Die Proteinbindestelle C/EBPbeta wird von dem *CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta* gebunden, das ein Mitglied der Familie der C/EBP Transkriptionsfaktoren ist. Sie gehören zu der Gruppe der bZIP-Proteine. Diese bilden Dimere mit Hilfe von Leucin-Zipper-Strukturen und binden mit der basischen Region an palindromische DNA-Sequenzen. Diese Faktoren akzeptieren neben der Idealsequenz 5'-GATTGCGCAATC-3' jedoch auch Bindestellen mit unvollkommener Symmetrie, wie etwa der Faktor C/EBPbeta. Die C/EBP-Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der *acute phase response*

der Immunantwort. C/EBPbeta wird durch Cytokine wie IL-1, IL-6 und TNF induziert und aktiviert seinerseits die Transkription des Cytokins Interleukin-6 (Akira et al., 1990). Dieses Protein ist ein Aktivator der Transkription. Inhibiert wird C/EBPbeta durch Heterodimerisierung mit den Faktoren c-Jun und c-Fos (Hsu et al., 1994).

Das *Glucocorticoid Response Element* (GRE) wird von dem Glucocorticoid-Rezeptor (GR) gebunden. Der Glucocorticoid-Rezeptor wird durch die Bindung der Hormonliganden aktiviert und transloziert aus dem Cytosol in den Nucleus. Nach Dimerisierung kann dieser an ein entsprechendes GR-Element binden und eine Aktivierung oder Repression der Expression des Gens bewirken. Inhibiert wird dieser Faktor über Protein-Protein-Wechselwirkungen durch die Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos. In Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren, die in Regulationseinheiten zusammengefasst sind, wirken diese synergistisch und aktivierend auf die Transkription (Tseng et al., 2001). Enthält das Modul den Transkriptionsfaktor C/EBPbeta, so verstärkt dieser die Aktivierung der Transkription durch GR (Savoldi et al., 1997 und Terada et al., 2001).

Die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor NF-1 überlappt mit derjenigen von GRE und bildet mit diesem das zweite Modul. NF-1 bindet an die Erkennungssequenz 5'-TTGGC-3' und ist ein Aktivator der Transkription. Cluster dieser Erkennungssequenz sind in vielen viralen Enhancer wie beispielsweise in Papillomviren, aber auch in neuronalen Promotoren wie dem *Neural cell adhesion Molecule* (NCAM; Garlatti et al., 1996) vorhanden. Die NF-1 Familie von Transkriptionsfaktoren besteht in Vertebraten aus vier Mitgliedern. Aus jedem Mitglied entstehen durch differentielles Spleißen neun weitere Proteine, die sowohl Aktivatoren als auch Repressoren darstellen. Zielgene der NF-1 Proteine sind sowohl ubiquitär exprimierte als auch solche die hormonell oder entwicklungspezifisch reguliert werden. In Wechselwirkung mit dem Glucocorticoid-Rezeptor wird die Transkriptionsaktivität verstärkt (Garlatti et al., 1996). Sowohl das GREF-CEBP Modul als auch das GREF-MYOF Modul verstärken die Transkriptionsaktivität von Promotoren.

Die Deletionsstudien des Promotorbereiches und somit die Entfernung der NF-1-Bindestelle weisen daraufhin, dass diese Promotor-Module im Promotor *tmp 83.5* eine Funktion haben können.

Modul CREB-NFAT

Am 5'-Ende des Promotortestplasmids pProm 260 (Position -234) liegt das CREB-NFAT Modul, das möglicherweise zur Aktivierung des Promotors beiträgt. Eine leichte Abnahme der Promotoraktivität (Faktor 1,43) durch die Deletion des Sequenzbereiches -234 bis -140 (Promotorbereich Prom I, siehe Abb. 5.1) könnte damit erklärt werden. Das

Sequenzelement CREB erstreckt sich von Position –231 bis –24), liegt also zur Hälfte am 5'-Ende des pProm 260 und die NFAT-Bindestelle befindet sich an Position –203 bis –214. Die Bindestelle von CREB wird durch die Verkürzung von pProm 500 zu pProm 260 entfernt, so dass dieses Modul nicht mehr aktiv sein kann. Die CREB-Bindestelle wird von dem Transkriptionsfaktor ATF-1 gebunden. Der Transkriptionsfaktor ATF-1 ist ein Mitglied der CREB-Familie von bZIP Faktoren und vermittelt eine transkriptionelle Aktivierung. ATF-1 wird konstitutiv exprimiert und liegt nukleär in inaktiver Form vor. Aktiviert wird er über die cAMP-Signalkaskaden und Calcium/Calmodulin-Kinasen (Butscher, 1998).

Transkriptionsfaktoren der NFAT- (*Nuclear Factor of Activated T cells*) Familie werden überwiegend in Zellen des Immunsystems exprimiert. Sie sind entscheidende Faktoren in der Transkription von Cytokinen und anderen Genen der Immunantwort. Ein Mitglied dieser Proteinfamilie NFATc4 wird in Neuronen des Hippocampus exprimiert. Die Aktivität der NFAT-Proteine wird über die Calcium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin zellspezifisch reguliert. In Neuronen des Hippocampus vermittelt er die Genexpression nach elektrischer Aktivität (Graef et al., 1999). Die DNA-Bindedomäne der NFAT Proteine gleicht denen der Rel-Familie (Rao et al., 1997).

Modul EGR-NFAT

Ein weiteres Modul, das potenziell zur Aktivierung des Promotors beitragen kann, ist das EGR-NFAT Modul. Das Sequenzelement EGR befindet sich an Position –198 bis –187 und NF-AT wie oben beschrieben an Position –203 bis –214. Das EGR-Element (early growth response) wird von dem Transkriptionsfaktor Egr-2 (auch als Krox-20 bezeichnet) gebunden, ein Mitglied der immediate-early-gene-encoded Transkriptionsfaktoren. Diese Zinkfinger-Proteine aktivieren die Transkription von Zielgenen im ZNS, wie dem Hinterhirn, den glären Komponenten der Cranial- und Spinal-Ganglien und Neuronen. Induziert werden sie über viele verschiedene Stimuli, dazu gehören Substanzen, die an der Initiation der Zellteilung, -differenzierung und Apoptose beteiligt sind. In Kultur wird dieser Faktor auch über das verwendete Serum induziert. Diesem Faktor wird eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems zugeschrieben (Swirnoff und Milbrandt, 1995).

Bisher wurde das EGR-NFAT Modul nur im Promotor des Interleukin-2 Gens beschrieben (Decker et al., 1998). Hier binden Egr-Faktoren und NFAT unabhängig voneinander an nahegelegene Sequenzelemente und bilden dann einen EGR-NFAT-DNA Komplex, der eine starke Expression des IL-2 Gens in T-Zellen bewirkt. Egr allein hat nur eine geringe transaktivierende Wirkung, aber verstärkt die NFAT Transaktivierung im IL-2 Promotor um das 25fache.

Die beiden Promotor-Module CREB-NFAT und EGR-NFAT stehen über die NFAT-Bindestelle in Zusammenhang und könnten über kooperative Wechselwirkung durch den

Transkriptionsfaktor Egr-2 spezifisch in neuronalen Zellen aktiv sein. Die im Reporter-Gen-Assay durchgeführte Deletion des Bereiches -477 bis -234 (Prom H, siehe Abb. 5.1) führte zur Erniedrigung der Promotoraktivität in der Zelllinie Neuro-2a (Faktor 4,42), in der Zelllinie SK-N-SH aber zu einer Erhöhung der Expression (Faktor 2,15). Die Deletion führt zur Entfernung der ATF-1 Bindestelle, so dass möglicherweise die Module nicht mehr funktionell sind.

Modul NF- κ B-CREB

Das Promotormodul NF- κ B-CREB enthält Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren c-Rel und HLF. HLF gehört zur PAR-Familie von basischen Leucin-Zipper (bZIP) Faktoren. Die basische Region ist flankiert von einer Prolin- und sauren Aminosäuren reichen Domäne (proline- und acidic-amino-acid rich (PAR) Domäne) und einer Leucin-Zipper Dimerisierungsdomäne. Bisher wurden zwei Spleißvarianten des HLF-Gens identifiziert, HLF α und HLF β . HLF α wird in Leber, Niere und Gehirn und HLF β ausschließlich in der Leber exprimiert. Die HLF Bindestelle wird mit hoher Affinität von CREB-ATF Transkriptionsfaktoren gebunden, ebenfalls Mitglieder der bZIP Faktoren (Falvey et al., 1995). c-Rel gehört zur Familie der NF- κ B/Rel-Faktoren. Das Modul ist in der Literatur nicht näher beschrieben, aber ein Vergleich zeigt eine große Ähnlichkeit zu dem Enhancer-Modul CD28RE-TRE des Interleukin-2 Promotors in T-Zellen (Butscher et al., 1998). Dieser Enhancer enthält Bindestellen für c-Rel und ATF-1/CREB2, die synergistisch aktivierend auf die Transkription des Interleukin-2 Gens in T-Zellen wirken. Da sich die bindenden Transkriptionsfaktoren im Enhancer und NF- κ B-CREB Modul entsprechen, ist auch das NF- κ B-CREB Modul ein möglicher Enhancer des Promotors *timp* 83.5. Zumindest zeigen die Transfektionsstudien mit dem pProm 100/UTR in allen Zelllinien, das im 5'-nichttranslatierten Bereich ein Enhancer lokalisiert ist (Abb. 5.2).

5.6 Untersuchung des Kern- und proximalen Promotors *tmp* 83.5

Methodischer Ansatz

Die Identifizierung von sequenzspezifischen Protein-Bindungsstellen in der proximalen Promotorregion und dem Kernpromotor erfolgte über die DNase I Footprinting- und Band Shift-Analyse. Diese *in vitro* Verfahren sind zu Beginn der funktionellen Untersuchung von Promotoren besonders geeignet, um spezifische Protein-DNA-Wechselwirkungen zu detektieren und zu charakterisieren. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Durchführung und Eigenschaften können beide Methoden ergänzend eingesetzt werden, um die verschiedenen Proteine, die mit demselben DNA-Element interagieren, zu identifizieren. Die DNase I Footprinting-Analyse gibt die basengenaue Lage jeder Protein-Bindestelle innerhalb eines DNA-Bereiches von 100 bis 300 bp wieder. Hingegen ist die Band Shift Analyse mit kurzen DNA-Fragmenten von 20 bis 40 bp sensitiver. Sie kann Protein-DNA-Komplexe detektieren, auch wenn das Protein in geringer Konzentration im Zellkernproteinextrakt vorliegt. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B beispielsweise ist aufgrund seiner geringen Konzentration im Zellextrakt leichter im Band Shift zu detektieren. Jedoch kann in der Band Shift Analyse die kooperative Bindung von Proteinen an zwei Elemente nicht unterschieden werden (Carey und Smale, 2000).

In der DNase I Footprinting Analyse wurde der Promotorbereich von Position –252 bis +24 untersucht. Hierzu wurden zwei DNA-Fragmente eingesetzt, die sich zum einen von Position -138 bis +24 und zum anderen von Position –252 bis –71 erstrecken. Untersucht wurde jeweils der codierende und nichtcodierende DNA-Strang, da sich einige Protein-DNA-Bindungen besser an dem einen oder dem anderen Strang detektiert lassen und die Möglichkeit reduziert wird, dass eine Protein-DNA-Bindung in einer Region liegt, die gegenüber DNase I Hydrolyse resistent ist.

Die Analyse des DNA-Fragmentes –138 bis +24 ergab acht Protein-komplexierte Regionen des codierenden Stranges und neun des nichtcodierenden Stranges (siehe Abb. 5.3, I). Die Proteinbindungsstellen lagen in beiden Strängen an identischen Positionen mit lediglich ein bis zwei Basenpaaren Unterschied. Bereiche, die in einem Strang zwei Proteinbindungsstellen aufweisen, werden in dem anderen über beide Bereiche geschützt. Dies ist darin begründet, dass die DNA-bindenden Proteine nicht symmetrisch an beide Stränge binden, was zu einer unterschiedlichen räumlichen Ausdehnung der Footprints führte. Weiterhin wurden, um Artefakte auszuschließen, nur solche Protein-geschützten Regionen berücksichtigt, die mindestens 40 Basen von den Enden entfernt lagen (Carey und Smale, 2000).

Die DNase I Footprinting Analyse des Promotorbereiches –252 bis –71 wurde ebenfalls mit den komplementären DNA-Strängen durchgeführt. Jedoch zeigte die Analyse des

nichtcodierenden DNA-Stranges keine eindeutigen DNase I Protektionen, so dass dieser nicht zur Auswertung herangezogen werden konnte. Die Promotorregion ergab sechs Protein-geschützte Regionen im codierenden DNA-Strang (Abb. 5.3, I). Die Protein-Bindungen der überlappenden Sequenzbereiche beider DNA-Fragmente von Position -71 bis -138 bestätigten sich, aber erstreckten sich auch über Zwischensequenzen von zwei bis drei Basen, die in der Footprinting Analyse des Bereiches -138 bis +24 nicht geschützt waren. Bemerkenswert war, dass fast der gesamte untersuchte Sequenzbereich von Proteinen komplexiert wurde (Abb. 5.3, I).

Die Spezifität der Protein-Bindungen wurden in der Band Shift Analyse über Kompetitionen nachgewiesen. Hierzu wurden über den Sequenzbereich -258 bis +24 insgesamt zehn synthetische DNA-Fragmente mit der Bezeichnung A bis J (siehe Abb. 5.3, III und Abb. 4.38) verwendet. Die Spezifität der Protein-DNA-Komplexe wurde durch homologe und heterologe Kompetitionen untersucht. Zur heterologen Kompetition wurde jeweils ein DNA-Fragment verwendet, dessen Sequenz keine Homologie zu dem untersuchten aufwies. Zum Nachweis, dass es sich bei dem Protein-DNA-Komplex um Doppelstrang-spezifische Proteinbindungen handelt und nicht um Einzelstrang-bindende Proteine, wurde zusätzlich eine homologe Einzelstrang-Kompetition durchgeführt (siehe Abschnitt 4.8.2).

Sieben der eingesetzten DNA-Fragmente gingen spezifische DNA-Protein-Komplexe ein. Die Spezifität der Protein-DNA-Komplexe des DNA-Fragments C (Sequenzbereich -61 bis -28), in dem die Proteinbindungsstellen IIc und IIIc (bzw. IIInc und IVnc) des Footprints lagen (siehe Abb. 5.3, I und III), konnten trotz mehrmaliger Wiederholung der Band Shift Analyse nicht nachgewiesen werden. Die Korrelation der untersuchten DNA-Bereiche zu den Footprinting Analysen ist in Abbildung 5.3 dargestellt.

Die ermittelten Protein-gebundenen Sequenzbereiche des DNase I Footprinting, die auch durch Band Shift Analyse in Form von sequenzspezifischen Komplexen bestätigt wurden, sind durch computergestützte Analyse auf bekannte Bindestellen für Transkriptionsfaktoren untersucht worden. Hierzu wurde das Programm MatInspector professional verwendet, das eine Sammlung von ca. 400 charakterisierten Transkriptionsfaktor-Bindestellen enthält (Quandt et al., 1995). Die Zuordnung der ermittelten Transkriptionsfaktoren, die an den jeweiligen Sequenzbereich binden können, ist in Abbildung 5.3 (II) dargestellt.

Der Kernpromotor *tmp 83.5*

Interessanterweise befindet sich am Startpunkt der Transkription +1 das Initiatorelement Muscle-INI, das auch im Promotor *sp 83.5* identifiziert wurde. Dieser Initiator vermittelt den Beginn der RNA-Synthese und ist in Promotoren von Muskelgenen wie Aktin, Myosin und Acetylcholin-Rezeptoren und in den Promotoren neuronaler Gene der Acetylcholinesterase und der Aldolase C beschrieben (Lopez und Fickett, Homepage). Andere Kernpromotorelemente, die ebenfalls die Startstelle der Transkription definieren, wie die TATA-Box an Position –25 bis –30 und die TFIIB-Bindestelle BRE an Position –32 (Lagrange et al., 1998) sind nicht vorhanden. Der Startpunkt und die Direktionalität wird in dem Promotor *tmp 83.5* durch den Initiator festgelegt. Weitere potenzielle Kernpromotorelemente sind 13 bp stromabwärts die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Egr-1 und stromaufwärts die Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren N-Oct-3 sowie AP4 (siehe unten). Egr-1 gehört zu den Immediate Early Genen, dessen Expression über Wachstums- und Differenzierungssignale im peripheren und zentralen Nervensystem induziert wird. Neben dem Nervensystem wird die Expression auch in nichtneuronalen Zellen stimuliert. Funktionelle Egr-1 Bindungsstellen sind in vielen Promotoren neuronaler Gene wie Synapsin II und Acetylcholinesterase aktiv (Peterson et al., 1995).

Der proximale Promotor *tmp 83.5*

Der proximale Promotorbereich –40 bis –230 enthält eine Vielzahl zellspezifisch wirkender Bindestellen für Aktivatoren und Repressoren, aber keine typischen Elemente, wie sie bei konstitutiv exprimierten Haushaltsgenen zu finden sind (Abb. 5.3). CAAT-Box und GC-Box sind die typischen Elemente für eine konstitutive, ubiquitäre Expression. Ihr Fehlen steht gut im Einklang mit der neuronalspezifischen Synthese der *mRNA sp 83.5*.

Zu den Transkriptionsfaktoren, die in bestimmten Geweben des Gehirns exprimiert werden und dort als Regulatoren der Transkription aktiv sind, gehören die Ikaros-Proteine. Die Familie der Zinkfinger-Proteine Ikaros enthält fünf Proteine, die alternative Spleißprodukte sind. Neben dem lymphatischen System werden die Ikaros-Proteine spezifisch im Corpus striatum exprimiert. Die Rolle dieser Faktoren in diesem Gehirnbereich ist bisher nicht bekannt (Molnar und Georgopoulos, 1994).

Der MEF2 (*Myocyte-enhancer factor-2*) Transkriptionsfaktor wird in Muskelzellen und im Gehirn exprimiert. MEF2 erkennt im Gehirn eine andere Bindungsstelle als in den Promotoren der Muskelzellen. Die Rolle dieses Faktors in der Regulation gehirnspezifischer Gene ist bisher nicht bekannt (Andres et al., 1995).

In der proximalen Promotorregion findet man mehrere Bindestellen für die induzierbaren Transkriptionsfaktoren AP-1, AP2 und AP4. Der Transkriptionsfaktor AP-1 besteht aus Dimeren der Familienmitglieder Fos, Jun und ATF. Dieser Faktor gehört ebenfalls zu den Immediate Early Genen und wird durch eine Reihe unterschiedlicher Stimuli aktiviert. Die Zahl dieser Transkriptionsfaktoren ist im Nervensystem nach bestimmten Stimuli besonders hoch und eine Vielzahl neuronaler Gene werden über diesen Transkriptionsfaktor reguliert. Diese Faktoren bilden über Dimerisierungspartner und Cofaktoren Multiproteinkomplexe mit zell- und stimulus-spezifischer transkriptioneller Aktivität (Chinenov und Kerpola, 2001). AP2 ist ein Transkriptionsaktivator, der über den cAMP-Signalweg aktiviert wird. Dieses Protein wird in verschiedenen Neuronen exprimiert und reguliert die Transkription einer Vielzahl neuronaler Gene (Baskin et al., 1997). Funktionelle AP2 und AP-1 Bindestellen sind in fast allen neuronalen Promotoren zu finden. Über den cAMP-induzierbaren Transkriptionsfaktor AP4 ist bisher nur wenig bekannt. AP4 DNA-Bindungsstellen überlappen in den meisten Fällen mit AP-1 Sequenzen und treten mit diesem Faktor in Wechselwirkung. Diese AP-1/AP4-Faktoren wirken synergistisch in Enhancern, beispielsweise im Gen des Opioid-Vorläuferprotein Proenkephalin (Mermod et al., 1988).

Der proximale Promotor von Position -40 bis -230 enthält zahlreiche Bindestellen für zellspezifische Transkriptionsfaktoren (siehe Abb.5.3). Hierzu zählen neuronale Transkriptionsfaktoren und solche, die in bestimmten Geweben des Gehirns exprimiert werden. Im Promotorbereich -98 bis -122 befindet sich ein Promotormodul, das von neuronspezifischen Faktoren N-Oct-3, HNF3 β , Pit1 und Oct-6 gebunden wird. DNase I Footprinting Experimente zeigten in diesem Bereich Proteinbindungen, deren Sequenzspezifität durch die Band Shift Analyse bestätigt wurden (siehe Abb. 5.4, I und III).

N-Oct-3, Pit1, Oct-6 und Oct-1 gehören zur POU-Familie von Transkriptionsfaktoren, die während der Entwicklung und im adulten Nervensystem exprimiert werden (Phillips und Luisi, 2000). Die Faktoren N-Oct-3 und Oct-6 werden sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen exprimiert. Oct-6 wird in nur in neuronalen Vorläuferzellen, aber nicht in adulten Zellen exprimiert (Schreiber et al., 1993).

Pit1 ist ein Transkriptionsaktivator, der in Neuronen, in der Hypophyse sowie im Hypothalamus über die cAMP-Signalkaskade aktiviert wird. In der Hypophyse und im Hypothalamus reguliert Pit1 die Hormonsekretion (Phillips und Luisi, 2000).

HNF3 β gehört zur Familie der Winged Helix/Forkhead Proteine, die ebenfalls spezifisch im Nervensystem exprimiert werden. Dieser Faktor bindet kooperativ mit N-Oct-3 an ein überlappendes Sequenzmotiv. Die überlappende Bindestelle für die neuronspezifischen Transkriptionsfaktoren N-Oct-3 und HNF3 β wurde als wesentliches Element für die neuronale Expression des Aldolase C Gens durch Reportergenstudien in transgenen

Mäusen identifiziert (Skala et al., 1998). Drei weitere neuronale Gene (AADC, Corticotropin-releasing-Hormon und Gonadotropin-releasing Hormon) enthalten ebenfalls dieses Motiv. Das POU/Winged Helix-Motiv könnte demnach ein wichtiges gehirnspezifisches Element der neuronalen Expression sein. Eine weitere potenzielle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor N-Oct-3 befindet sich 28 bp stromaufwärts und für Oct-6 170 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes.

Ein weiterer neuronspezifischer Transkriptionsfaktor ist HEN1, der an der Regulation neuronaler Gene während der Entwicklung des Nervensystems beteiligt ist und dessen Aktivität über Nervenwachstumsfaktoren induziert wird. In Neuroblastomzelllinien liegt dieser Faktor ebenfalls vor (Brown und Baer, 1994).

Egr-2 ist ein Transaktivator, der im frühen Zentralnervensystem und in adulten Neuronen sowie in den glären Komponenten von Spinal- und Cranial-Ganglien exprimiert wird. Dieser Faktor gehört zu den Immediate Early Genen und wird über Signale der Differenzierung, Mitose und Apoptose induziert (Swirnoff und Milbrandt, 1995).

CDP (CCAAT displacement protein) ist ein Repressor, der eine wichtige Rolle in diversen Differenzierungsprogrammen von Vorläuferzellen spielt. In adulten Zellen wird die Expression von CDP herabgesetzt (Andres et al., 1994).

Typische Elemente, wie sie bei konstitutiv exprimierten Haushaltsgenen vorkommen, sind, wie bereits erwähnt, nicht vorhanden. Der proximale Promotor von Haushaltsgenen ist GC-reich und enthält mehrere GC-Box, die für eine konstitutive, ubiquitäre Expression notwendig sind. Ihr Fehlen steht gut im Einklang mit der neuronalspezifischen Synthese der mRNA *tmp 83.5*.

Die Kern- und proximalen Bereiche neuronaler Promotoren, die im gesamten Nervensystem exprimiert werden, enthalten ebenfalls einen hohen GC-Gehalt (> 60 %) und zahlreiche Bindestellen für den konstitutiv ubiquitär exprimierten Transkriptionsaktivator SP1.

Dahingegen sind die Faktoren der POU-Familie und die induzierbaren Transkriptionsfaktoren AP-1 und AP2 häufige Vertreter neuronaler Promotoren, die eine Expression in bestimmten Neuronentypen regulieren (Wagner, 1995; Chin et al., 1999, Skala et al., 1998).

Welche dieser potenziellen Bindestellen tatsächlich funktionell relevant für die Aktivität des Promotors *tmp 83.5* sind, lässt sich nur durch weitere Untersuchungen experimentell belegen (z.B. durch Transkriptionsfaktor-spezifische Antikörperkompetition in Band-Shift-Analysen, Carey und Smale, 2000).

Die hohe Zahl an neuronspezifischen Transkriptionsfaktor-Bindestellen bestätigt den neuronalen Syntheseort der mRNA *tmp 83.5*.

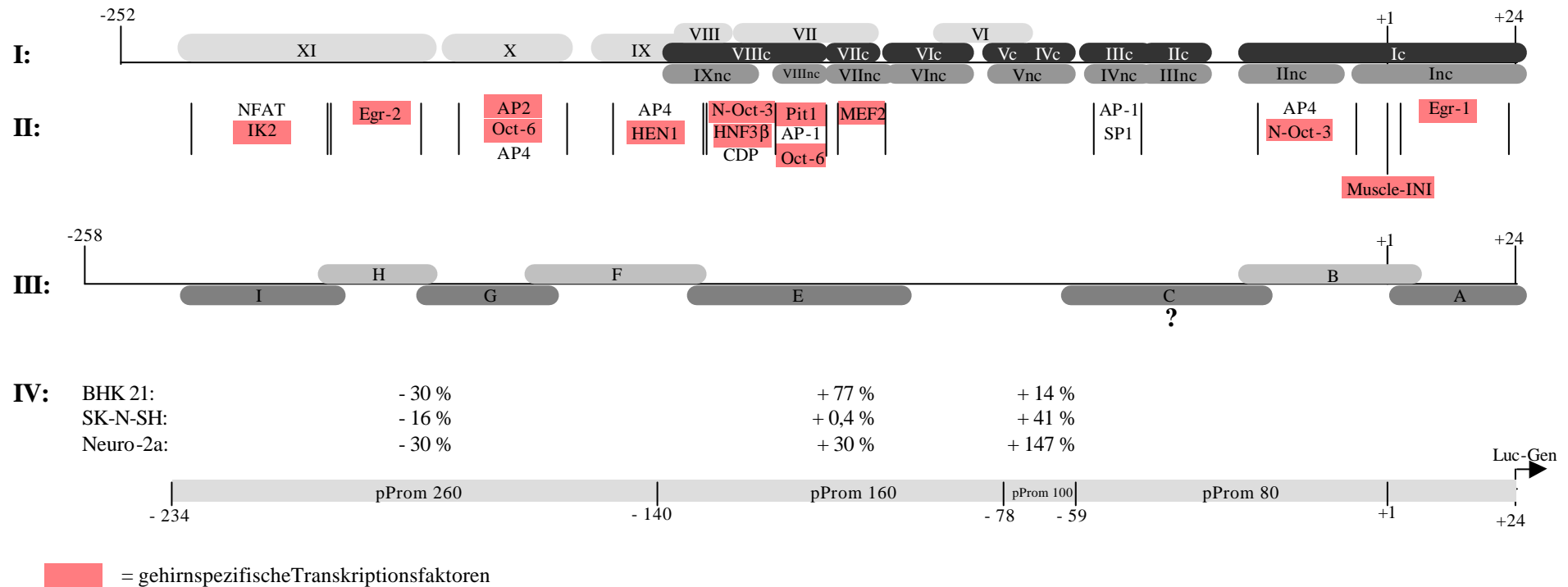


Abb. 5.3: Korrelation der Ergebnisse aus DNase I Footprinting Analyse (I), Band Shift Analyse (III), Analyse des Promotorbereiches auf bekannte Transkriptionsfaktor-Bindestellen (II) und Transfektionen der Promotortestplasmide pProm 260 bis pProm 80 (IV). I: Die ermittelten Protein-Bindungsstellen des codierenden (c) und nichtcodierenden (nc) DNA-Stranges in der DNase I Footprinting Analyse. Die mit Ic bis VIIIc und Inc bis IXnc nummerierten Bereiche wurden mit dem DNA-Fragment erhalten, das sich von Position +24 bis -138 in dem Promotor erstreckt. Die Protein-DNA-Bindungsstellen VI bis XI wurden mit dem codierenden Strang des DNA-Fragmentes -71 bis -252 ermittelt; II: Korrelation der ermittelten Bindungsstellen zu bekannten Transkriptionsfaktoren, die durch computergestützte Analyse der Promotorsequenz erhalten wurden; III: Die in die Band Shift Analyse eingesetzten DNA-Fragmente, die zu spezifischen DNA-Protein-Komplexen führten. Die Spezifität der Protein-DNA-Bindungen unter Verwendung des DNA-Fragmentes C konnte aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse nicht nachgewiesen werden. Die Sequenzbereiche der eingesetzten DNA-Fragmente sind in Abschnitt 4.8.2 in der Abbildung 4.38 angegeben. IV: Die Auswirkung der deletierten Promotorabschnitte auf die Expressionsrate des Reportergens in der nichtneuronalen Zelllinie BHK 21 und in den neuronalen Zelllinien SK-N-SH sowie Neuro-2a. Erläuterung siehe Text.

5.7 Regulation der neuronspezifischen Transkription

Im Nervensystem werden ungefähr 30-40 Prozent der dreißig- bis vierzigtausend Säugergene exprimiert. Die molekularen Mechanismen, auf denen die Regulation der spezifischen Genexpression im Gehirn beruhen, sind im Vergleich mit denen in anderen differenzierten Geweben wenig verstanden. Dies liegt an der Komplexität dieses Organs, das aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen besteht. Einige der neuronalen Gene werden hochspezifisch nur in einer Subpopulation von Neuronen exprimiert, wohingegen andere (hierzu zählen vor allem Gene von Isoenzymen des allgemeinen Stoffwechsels) in allen Neurontypen auftreten. Das Verständnis der molekularen Mechanismen, auf denen die Regulation der neuronspezifischen Genexpression beruht, hat sich in den letzten Jahren wesentlich erweitert. Promotoranalysen neuronspezifischer Gene zeigen zwei entscheidende Mechanismen der Transkriptionskontrolle, die zu einer gewebespezifischen Expression der Gene führen. Zum einen werden sie über gewebespezifische Silencer bzw. Repressoren reguliert, die eine ubiquitäre Transkription in allen nichtneuronalen Zelltypen inhibieren. Zum anderen werden sie über neuronalspezifische Aktivatoren und Stimulus-induzierte Transkriptionsfaktoren gezielt im Nervensystem exprimiert. Beispiele hierfür sind die Gene für Synapsin II, das Enzym AADC (Aromatische L-Aminosäure Decarboxylase), Aldolase C und das mikrotubuli-assoziierte Protein Tau (Chin et al., 1999; Skala et al., 1998 und Wagner, 1995). Die meisten neuronalen Gene fallen in die erstgenannte Kategorie, deren Promotoren häufig über den Repressor NRSF (Neuron-restrictive-Silencer-Factor) reguliert werden. Die Beteiligung des NRSF an der Regulation der neuron-spezifischen Transkription konnte in den letzten Jahren für eine Reihe von Genen nachgewiesen werden. Hierzu zählen beispielsweise die neuronalen Gene für Synapsin I, den spannungsabhängigen Natriumkanal des Typ II, den m4 muskarinischen Acetylcholinrezeptor und das Wachstums-assoziierte Protein SCG10 (siehe Tabelle 2.1, Abschnitt 2.5.1).

Silencer sind wichtige Regulatoren für zwei Säuger-Systeme mit der größten zellulären Diversität, das Immunsystem und das Nervensystem (Wagner, 1995; Carey und Smale, 1999).

5.7.1 Bedeutung des NRSE für die neuronspezifische Regulation der Transkription

Funktionelle NRSE in den regulatorischen Regionen neuronaler Gene verhindern die Transkription in nichtneuronalen Zellen und neuronalen Vorläuferzellen. Weiterhin sind viele neuronale Gene Mitglieder von Multigenfamilien, in denen einzelne Familienmitglieder auch in nicht-neuronalen Zellen exprimiert werden. Ein negativer, durch das NRSE vermittelter Regulationsmechanismus, ist für die Kontrolle der

Expression von Genfamilien geeignet. Werden konstitutive Enhancer oder Aktivatoren unter den einzelnen Familienmitglieder geteilt, wird die neuronalspezifische Expression eines einzelnen Gens durch Repression in nichtneuronalen Zellen hervorgerufen. Weiterhin ist NRSF ein Master-Regulator für neuronspezifische Gene, die im gesamten Nervensystem exprimiert werden. NRSF wird in nichtneuronalen Geweben ubiquitär exprimiert. Die Deletion bekannter Gene für neuron-spezifische Transkriptionsfaktoren wie N-Oct-3, HNF3 β oder MASH-1 führte hingegen nur zu begrenzten Defekten in bestimmten Arealen des Nervensystems (Chin et al., 1999). Da zahlreiche neuronale Gene, wie Synapsin I, jedoch im gesamten Nervensystem exprimiert werden, sind für die Kontrolle der neuron-spezifischen Genexpression Transkriptionsfaktoren notwendig, die in allen Nervenzellen funktionell sind. NRSF erfüllt als negativer Regulator der neuron-spezifischen Genexpression die Voraussetzung, die für eine kontinuierliche aktive Kontrolle dieser neuronalen Gene notwendig ist. Promotoren dieser Gene enthalten keine weiteren Bindestellen für zellspezifisch wirkende Transkriptionsfaktoren. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass das NRSE auch als Aktivator der Transkription in neuronalen Zellen wirken kann, wenn es weniger als 50 bp stromaufwärts der TATA-Box oder in der 5'-UTR lokalisiert ist (Bessis et al., 1997). In nichtneuronalen Zellen wirkt er jedoch immer reprimierend.

Die distale Promotorregion *tmp* 83.5 zwischen Position -4.321 bis -2.053 weist drei und zwischen Position -745 bis -564 ein NRSE-Sequenzelemente auf. Wenn ein funktioneller NRSE Silencer in diesen Promotorbereichen vorhanden ist, sollte die Transkription des Reportergens nur in neuronalen Zelllinien, aber nicht in nichtneuronalen beobachtet werden können. Zudem sollte die Deletion dieser Bereiche zu einem Anstieg der Expressionsrate in nichtneuronalen Zellen führen. Die transienten Transfektion des Wildtyp-Promotors zeigten in der nichtneuronalen Zelllinie BHK 21 zwar eine geringe, aber dennoch vorhandene Promotoraktivität, und die Deletion des Bereiches -4.321 bis -2.053 führte zu einer leichten Reduktion der Expressionsrate des Reportergens, nicht aber zu einem deutlichen Anstieg der Expression. Die Deletion des anderen Promotorbereiches mit mutmaßlicher NRSE-Sequenzelement (Position -745 bis -564) führte zu keiner Änderung der Promotoraktivität. In der 5'-nichttranslatierten Region liegen ebenfalls zwei potenzielle Bindestellen für den NRS-Faktor. Die transienten Transfektionen der Promotorkonstrukte mit 5'-UTR ergaben jedoch eine starke transkriptionelle Aktivität in allen verwendeten Zelllinien. Die Ergebnisse der Deletionsstudien weisen daraufhin, dass der Promotor *tmp* 83.5 keine funktionellen NRSE Silencerelemente in diesen Kontrollregionen enthält. Dies lässt vermuten, dass der Promotor *tmp* 83.5 nicht durch NRSE-Silenceraktivität reguliert wird.

Eine alternative Erklärung dafür wäre aber auch, dass die Silenceraktivität durch die fehlende Chromatinstruktur in transienten Transfektionen nicht ausgeübt werden kann. Ein

Phänomen, das dazu führt, dass bei vielen Promotoruntersuchungen mittels transienter Transfektionen Silencer nicht identifiziert werden können. Erst die stabile Transfektion oder die Analyse des Promotors in Transgenen führte zum Nachweis des Silencers (Duncan et al., 1996). Beispielsweise inhibiert der CD4 Silencer des Immunsystems im Synapsin II Gen die Transkription nur in transgenen Mäusen, aber nicht in transienten Transfektionen. Die Ursache liegt auch hier in der fehlenden Chromatinstruktur der Promotortestplasmide in transienten Transfektionen, die für die Funktionalität des Silencers Voraussetzung ist (Chin et al., 1999).

Weiterhin kann ein Silencer in Exons und Introns oder intergenischen Bereichen liegen und so über große Distanzen hinweg seine inhibierende Wirkung erzielen. Somit müssten ausgedehntere Abschnitte des Gens 83.5 noch in die Analyse einbezogen werden.

5.8 Regulationsmodell für die Expression der mRNA *tmp* des Gens 83.5

Zusammenfassend kann jetzt ein Regulationsmodell für die Expression der mRNA *tmp* des Gens 83.5 entworfen werden. In Abbildung 5.4 sind die mit den verschiedenen Methoden (Promotordeletionsstudien, DNase I Footprinting Analyse, Band Shift Analyse und Sequenzanalyse) identifizierten Bereiche des Promotors *tmp* 83.5 mit Einfluss auf die Expressionsrate des Reportergens dargestellt.

Die Bereiche, die nach den Ergebnissen der 5'-Deletionsstudien in transienten Transfektionen für eine hohe Transkriptionsinitiationsrate notwendig sind, wurden mit (+) und solche für eine niedrige mit (-) gekennzeichnet. Jene Bereiche davon, die nur in einer der beiden neuronalen Zelllinien eine entsprechende Wirkung zeigten, sind als quergestreifte Kästen dargestellt. Bei den DNase I Footprinting Analysen wurden nur die Sequenzbereiche der Bindestellen berücksichtigt, die in der Band Shift Analyse als sequenzspezifische Protein-Bindungen charakterisiert werden konnten. Schließlich wurden die in der DNase I Footprinting Analyse identifizierten Sequenzbereiche, denen eine Homologie zu bekannten Protein-Bindungsstellen nachgewiesen werden konnte, als Balken dargestellt. Neuron- bzw. gehirnspezifische Bindestellen sind farblich von ubiquitären Transkriptionsfaktor-Bindestellen unterschieden worden.

(1) Durch die Ergebnisse der 5'-Deletionsstudien in transienten Transfektionen von neuronalen und nichtneuronalen Zelllinien konnten drei Promotorbereiche eingegrenzt werden, die eindeutig eine signifikante Wirkung auf die Transkriptionsinitiationsrate des Promotors *tmp* 83.5 ausüben.

- a) Der 5'-nichttranslatierte Bereich 24 bp bis 586 bp stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes zeigte sowohl in den neuronalen als auch in der

nichtneuronalen Zelllinie eine deutliche Steigerung der Transkriptionsrate (Abb. 5.2). In dieser Region könnte demnach ein starker Aktivator, z.B. ein Enhancer, oder mehrere Aktivatoren lokalisiert sein, deren Effekte sich summieren. Da dieser Bereich keine Zellspezifität aufwies und nicht unter induzierten Bedingungen gearbeitet wurde, handelt es sich um einen ubiquitären, konstitutiven Aktivator. Der Wildtyp-Promotor alleine ermöglichte eine vergleichsweise geringe Expressionsrate. Erst durch das Anfügen der 5'-nichttranslatierten Region wurde die Expressionsrate in allen Zelllinien stark gesteigert. Daher ist zu folgern, dass unter nicht-induzierten Bedingungen eine Beteiligung der 5'-UTR an der Transkriptionsinitiation notwendig ist.

- b) Der Promotorbereich -945 bis -745 (Prom E, siehe Abb. 5.1) führte ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der Expressionsrate, aber nur in den neuronalen Zelllinien. Dieser Bereich enthält somit positiv wirkende Elemente der Transkription, die von neuronspezifischen Transkriptionsfaktoren reguliert werden.
- c) Stromaufwärts im Promotorbereich -1.327 bis -945 (Prom D, siehe Abb. 5.1) liegen ebenfalls neuronspezifische Regulationselemente, die jedoch reprimierend auf die Transkription wirken.

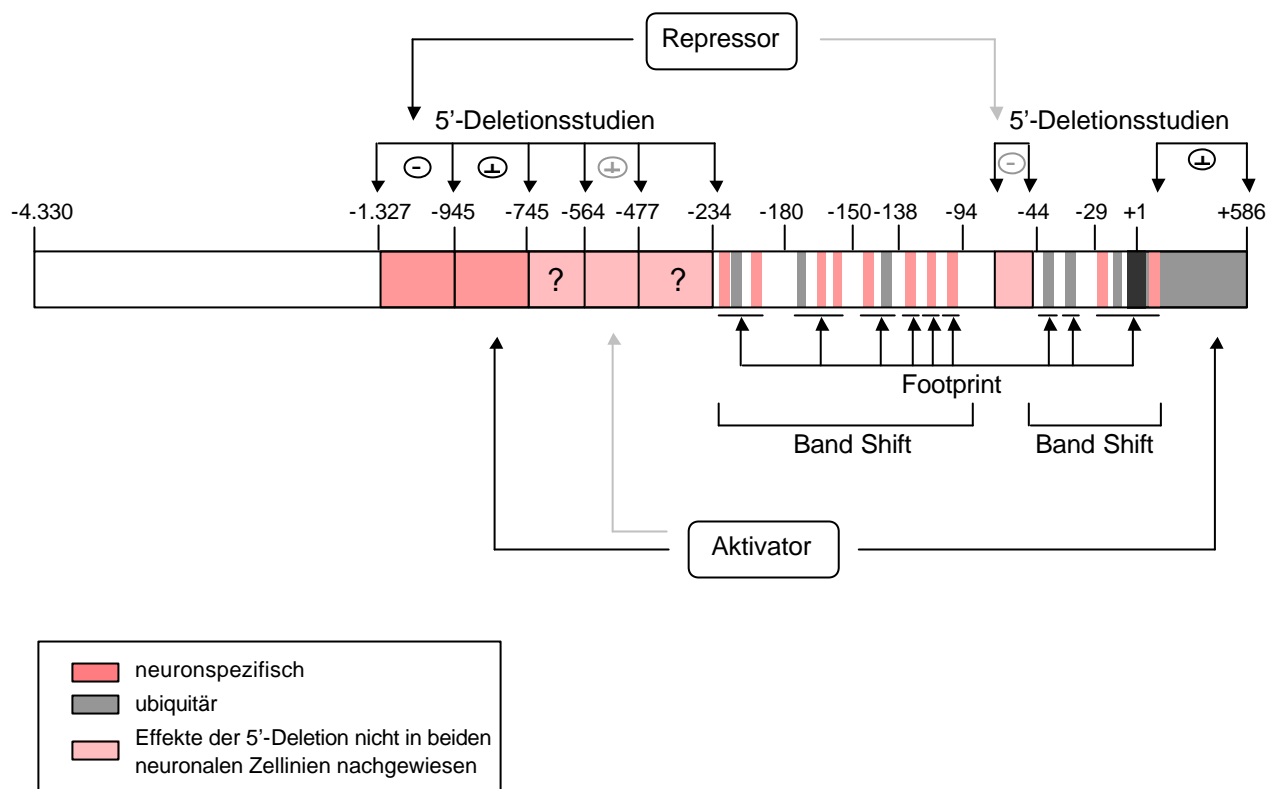


Abb. 5.4: Modell der Regulation des Promotors *tmp 83.5* auf der Ebene der Transkription.
Erläuterung im Text.

Zwei weitere mögliche neuronspezifische regulatorische Promotorabschnitte befinden sich im Bereich -564 bis -477 (Prom G) und -78 bis -59 (Prom K, siehe Abb. 5.2). Jedoch wurden diese Effekte nur in der murinen Zelllinie Neuro-2a, nicht aber in der humanen Zelllinie nachgewiesen. Ursache für diese Diskrepanz könnte der unterschiedliche Differenzierungszustand der Neuroblastomazelllinien sein. Der Promotorbereich -564 bis -477 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Expressionsrate und die Region -78 bis -59 zu einer Reduktion.

Darüber hinaus lieferten die Ergebnisse der Deletion der Regionen -745 bis -564 (Prom F) und -477 bis -234 (Prom H) zwar in beiden neuronalen Zelllinien signifikante, aber entgegengesetzte Effekte auf die Expressionsrate. Mögliche Ursache für dieses Phänomen könnte sein, dass in diesen Bereichen Promotor-Module mit mehreren Transkriptionsfaktor-Bindestellen lokalisiert sind. Aufgrund des unterschiedlichen Differenzierungszustandes der Zelllinien könnten in der einen oder anderen Zelllinie notwendige Transkriptionsfaktoren fehlen, so dass unterschiedliche Effekte auftreten.

(2) Der Kern- und proximale Promotor enthält zahlreiche potenzielle neuronspezifische Elemente

Die Sequenzanalyse des Promotorbereiches von 24 bp stromabwärts und 230 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes lieferte eine Vielzahl von Bindestellen für bekannte zellspezifische Transkriptionsfaktoren. Am Transkriptionsstartpunkt wurde ein Initiatorelement nachgewiesen, das auch in bereits charakterisierten neuronalen Promotoren funktionell ist. Eine TATA-Box in der Region -25 bis -30 ist nicht vorhanden, so dass das Initiatorelement über den allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIID den RNA Polymerase II Präinitiationskomplex am Startpunkt ausrichtet. Der Kernpromotorbereich bis zur Position -29 wurde in der DNase I Footprinting Analyse im codierenden Strang mit Proteinen geschützt (siehe Abb. 5.3, I). Auch die Band Shift Analyse lieferte zahlreiche Protein-DNA-Komplexe mit den entsprechenden DNA-Fragmenten (siehe Abb. 5.3, III). Das lässt vermuten, dass es sich hierbei um den RNA Polymerase II Proteinkomplex handelt. Der proximale Promotorbereich enthält viele potenzielle neuron- bzw. gehirnspezifische Transkriptionsfaktor-Bindestellen. Die Bindestellen in der Region -36 bis -43 konnten in der Band Shift Analyse aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse nicht bestätigt werden. Hierbei handelt es sich um potenzielle Bindestellen für den ubiquitären Transkriptionsaktivator SP1 und den induzierbaren Transkriptionsfaktor AP-1. Da dieser Promotorbereich (-59 bis +24) in den transienten Transfektion in allen Zellen zu einer Erhöhung der Expression des Reportergens führte, könnte der SP1 Transkriptionsfaktor an dieser Stelle einen wesentlichen Beitrag dazu leisten.

Die Deletionstudie des proximalen Promotors in den neuronalen Zelllinien ergab erst nach Deletion bis Position –59 eine erhöhte Expressionsrate. Da es sich bei den durch Homologievergleich gefundenen Bindungssequenzen in der Region –94 bis –230 hauptsächlich um Bindestellen für induzierbare Transkriptionsfaktoren handelt, lässt darauf schließen, dass diese in den Transfektionsstudien nicht aktiv waren.

5.9 Ausblick

Die Ergebnisse der transienten Transfektionen mit den Promotortestplasmiden, die den Bereich der 5'-nichttranslatierten Region enthielten, zeigten, dass hier starke ubiquitäre Kontrollregionen enthalten sind, die zu einer erhöhten Expression des basalen und Wildtyp-Promotors führten. Die eingesetzten Promotortestplasmide sollten nun alle mit der 5'-UTR erweitert werden und mit dieser Region nochmals in den verwendeten Zelllinien untersucht werden. Schwache Aktivitätsänderungen der Transkription könnten möglicherweise deutlicher ausfallen oder zusätzliche regulatorische Regionen identifiziert werden.

Interessant für die zukünftigen Untersuchungen sind die in den Deletionsstudien ermittelten funktionellen Promotorregionen des distalen Promotors und der 5'-UTR. Um die relevanten Kontrollregionen präziser innerhalb dieser Bereiche bestimmen zu können, müssen zusätzliche Deletionsstufen im Promotor eingeführt und die Promotortestplasmide in transienten Transfektionen untersucht werden. Weiterhin sollte auch die proximale Promotorregion in kleineren Schritten deletiert und in transienten Transfektionen analysiert werden.

Die Analyse der proximalen Promotorregion weist stark daraufhin, dass der Promotor tmp 83.5 über neuronenspezifische Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Die gewebespezifische Transkriptionskontrolle im Nervensystem basiert auf vielen Stimulus-induzierbaren Transkriptionsfaktoren. Darüber hinaus sind Neuroblastomazellen nicht vollständig differenziert. Deshalb sollten die Transfektionen in den verwendeten Zelllinien unter induzierbaren Bedingungen durchgeführt werden. Primär bieten sich hierzu neuronale Wachstumsfaktoren wie beispielsweise der Nervenwachstumsfaktor oder Retinsäure an. Zusätzlich sollten die Untersuchungen auch in differenzierten neuronalen Zelllinien oder Primärzellen durchgeführt werden.

Für die proximale Promotorregion muss gezeigt werden, welche Transkriptionsfaktoren an die ermittelten Bindestellen binden. Bisher liegen nur Anhaltspunkte vor, die sich aus den Sequenzhomologien zu bekannten Transkriptionsfaktor-Bindestellen ergaben. Dies sollte zum einen mittels Band-Shift-Kompetitionsexperimente mit Binde- oder Konsensussequenzen für bekannte Faktoren erfolgen. Zum anderen kann dies durch die

Einführung von Punktmutationen in die zur Band Shift Analyse eingesetzten DNA-Fragmente geschehen. Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der Identität des spezifischen DNA-Bindeproteins stellt die Supershift-Analyse dar. Hierzu wird die Band Shift Analyse in Gegenwart eines spezifischen DNA-Bindeprotein-Antikörpers durchgeführt. Wird hierbei entweder eine zusätzliche Bande mit verzögertem Laufverhalten (Supershift) oder eine deutliche Abnahme der Signalintensität des Band Shifts erhalten, weist dies daraufhin, dass es sich bei dem DNA-Bindeprotein um den bereits bekannten Faktor handelt bzw. dass dieser Faktor an dem identifizierten Band Shift Komplex beteiligt ist.

6 Literaturverzeichnis

- Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T. und Kishimoto, T. (1990). A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.*, **9**(6), 1897-1906.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J.D. (1995). *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage, Weinheim.
- Andres, V., Chiara, M.D. und Mahdavi, V. (1994). A new bipartite DNA-binding domain: cooperative interaction between the cut repeat and homeo domain of the cut homeo proteins. *Genes Dev.*, **8**, 245-257.
- Andres, V., Cervera, M. und Mahdavi, V. (1995). Determination of the consensus binding site for MEF2 expressed in muscle and brain reveals tissue-specific sequence constraints. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23246-23249.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, **49**(6), 729-739.
- Angel, P., Smeal, T. und Karin, M. (1989). Jun and v-jun contain multiple regions that participate in transcriptional activation in an interdependent manner. *New Biol.*, **1**(1), 35-43.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller und Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402.
- Attal, J., Puissant, C. und Houdebine, L.M. (1990). An improvement of a rapid method using Qiagen columns to purify plasmids. *Biotechniques*, **8**(3), 269-271.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1988). *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Baeuerle, P.A und Baltimore, D. (1996). NF-kappa B: ten years after. *Cell*, **87**(1), 13-20.
- Baeuerle, P.A. und Henkel, T.(1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 141-179.
- Bangsow, T., Schepelmann, S., Martin, C., May, M., Oberthür, A., Perl, S., Knüpfer, E., Zinke, H. und Gassen, H.G. (1998). Identification of a gene selectively expressed in the brain, which encodes a putative transmembrane protein and a soluble cytoplasmic isoform. *Eur. J. Biochem.*, **256**, 24-35.

- Bangsow, T. (1996). Charakterisierung des hirsnspezifisch exprimierten Gens 83.5 aus Schwein: Untersuchung verschiedener Transkripte, Bestimmung der genomischen Sequenz und Identifizierung spezifischer Promotorstellen. Dissertation, TU Darmstadt, Fachbereich Chemie.
- Baskin, F., Li, Y., Hersh, L.B., Davis, R.M. und Rosenberg, R.N. (1997). An AP-2 binding sequence within exon I of human and porcine choline acetyltransferase genes enhances transcription in neuronal cells. *Neuroscience*, **76**, 821-827.
- Bellefroid, E.J., Bourguignon, C., Hollemann, T., Ma, Q., Anderson, D.J., Kintner, C. und Pieler, T. (1996). X-Myt1, a *Xenopus* C2HC-zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. *Cell*, **87**, 1191-1202.
- Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L. und Weintraub, H. (1990). The protein Id: A negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, **64**, 49-59.
- Bessis, A., Champtiaux, N., Chatelin, L. und Changeaux, J.P. (1997). The neuron-restrictive silencer element: A dual enhancer/silencer crucial for patterned expression of a nicotinic receptor gene in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5906-5911.
- Biedler, J.L., Helson, L. und Spengler, B.A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.*, **33**(11), 2643-2652.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**(6), 1513-1523.
- Björklund, S., Almqvisti, G., Davidson, I., Nightingale, K.P. und Weiss, K. (1999). Global transcription regulators of eukaryotes. *Cell*, **96**, 759-767.
- Blackwood, E.M. und Kadonaga, J.T. (1998). Going the distance: A current view of enhancer action. *Science*, **281**, 61-63.
- Bohmann, D., Ellis, M.C., Staszewski, L.M. und Mlodzik, M. (1994). *Drosophila* Jun mediates Ras-dependent photoreceptor determination. *Cell*, **78**(6), 973-986.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brown, L. und Baer, R. (1994). HEN1 encodes a 20-kilodalton phosphoprotein that binds an extended E-box motif as a homodimer. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1245-1255.
- Burke, T.W. und Kadonaga, J.T. (1996). *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.*, **11**, 3020-3031.
- Burke, T.W. und Kadonaga, J.T. (1997). The downstream core promoter element, DRE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAF_{II}60 of *Drosophila*. *Genes Dev.*, **11**, 3020-3031.

- Burley, S.K. und Roeder, R.G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 769-799.
- Butscher, W.G., Powers, C., Olive, M., Vinson, C. und Gardner, K. (1998). Coordinate transactivation of the interleukin-2 CD28 response element by c-Rel and ATF-1/CREB2. *J. Biol. Chem.*, **273**(1), 552-560.
- Cao, X. und Brosius, F. (1993). Direct sequencing of double-stranded PCR products isolated from conventional agarose gels. *BioTechniques*, **15**(3), 384-386.
- Carey, M. und Smale, S.T. (2000). Transcriptional regulation in eukaryotes. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Chen, R.H., Juo, P.C. und Blenis, J. (1996). Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene*, **12**(7), 1493-1502.
- Chen, Y.R. und Tan, T.H. (1999). Mammalian c-Jun N-terminal kinase pathway and STE20-related kinases. *Gene Ther. Mol. Biol.*, **4**, 83-98.
- Chin, L.S., Qiang, F., Kachinsky, A., Jabren, G., Niu, Y. und Li, L. (1999). Neuron-specific and developmental regulation of the synapsin II gene expression in transgenic mice. *Mol. Brain Research*, **67**, 239-246.
- Chinenov, Y. und Kerppola, T.K. (2001). Close encounter of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*, **20**(19), 2438-2452.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanat-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.
- Claret, F.X., Hibi, M., Dhut, S., Toda, T. und Karin, M. (1996). A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature*, **383**(6599), 453-457.
- Curran, T., Peters, G., Van Beyerren, C., Teich, N.M. und Verma, I.M. (1982). FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *J. Virol.*, **44**(2), 674-682.
- Daniel, S. und Kim, K. (1996). Sp1 mediates glucose activation of the acetyl-CoA carboxylase promoter. *J. Biol. Chem.*, **271**, 1385-1392.
- Decker, E.L., Skerka, C. und Zipfel, P.F. (1998). The early growth response protein (EGR-1) regulates interleukin-2 transcription by synergistic interaction with the nuclear factor of activated T cells. **273**(41). 26923-26930.
- Desjarlais, J.R. und Berg, J.M. (1993). Use of a zinc-finger consensus sequence framework and specificity rules to design specific DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**(6), 2256-2260.
- Duncan, D.D., Adlam, M. und Siu, G. (1996). Asymmetric redundancy in CD4 silencer function. *Immunity*, **4**, 301-311.

- Emami, K.H., Jain, A. und Smale, S.T. (1997). Mechanism of synergy between TATA and initiator: Synergistic binding of TFIID following a putative TFIIA-induced isomerization. *Genes Dev.*, **11**, 3007-3019.
- Emami, K.H. und Carey, M. (1992). A synergistic increase in potency of a multimerized VP16 transcriptional activation domain. *EMBO J.*, **11**, 5005-5012.
- Failor, B.U. (1999). Charakterisierung der Promotorregion I des hirnspezifisch exprimierten Gens 83.5. Diplomarbeit, TU Darmstadt, Fachbereich Chemie.
- Falvey, E., Fleury-Olela, F. und Schibler U. (1995). The rat hepatic leukemia factor (HLF) gene encodes two transcriptional activators with distinct circadian rhythms, tissue distributions and target preferences. *EMBO J.*, **14**, 4307-4317.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. und Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**(21), 7413-7417.
- Forget, D., Robert, F., Grondin, G., Burton, Z.F. und Greenblatt, J. (1997). RAP74 induces promoter contacts by RNA polymerase II upstream and downstream of a DNA bend centered on the TATA box. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 7150-7155.***
- Fourney, M.R., Myakoshi, J., Day, R. und Paterson, M.C. (1988). Northern Blotting: efficient RNA staining and transfer. *Focus*, **10-1**, 5-6.
- Franzoso, G., Bours, V., Parks, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kelly, K. und Siebenlist, U. (1992). The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition. *Nature*, **359**(6393), 339-342.
- Frech, K., Danescu-Mayer, J. und Werner, T. (1997). A novel method to develop highly specific models for regulatory units detects a new LTR in GenBank which contains a functional promoter. *J. Mol. Biol.*, **270**(5), 674-687.
- Frengen, E., Thomsen, P., Kristensen, T., Kran, S., Miller, R. und Davies, W. (1991). Porcine SINEs: characterization and use in species-specific amplification. *Genomics*, **10**(4), 949-956.
- Galas, D.J. und Schmitz, A. (1978). DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.*, **5**(9), 3157-3170.
- Garlatti, M., Aggerbeck, M., Bouguet, J. und Barouki, R. (1996). Contribution of a nuclear factor 1 binding site to the glucocorticoid regulation of the cytosolic aspartate aminotransferase gene promoter. *J. Biol. Chem.*, **271**(51), 32629-32634.

- Gass, P., Bruehl, C., Herdegen, T., Kiessling, M., Lutzenberg, M. und Witte O.W. (1997). Induction of FOS and JUN proteins during focal epilepsy: congruences with and differences to [^{14}C] deoxyglucose metabolism. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **46**(1-2), 177-184.
- Giguere, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R. und Otulakowski, G. (1994). Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of RORalpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptor. *Genes Dev.*, **8**, 538-553.
- Gingrich, J.R. und Roeder, J. (1998). Inducible gene expression in the nervous system of transgenic mice. *Annu. Rev. Neurosci.*, **21**, 377-405.
- Goodrich, J.A., Cutler, G. und Tijan, R. (1996). Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell*, **84**, 825-830.
- Gorski, K., Carneiro, M. und Schibler, U. (1986). Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter. *Cell*, **47**, 767-776.
- Gosh, G. Huang, D.B. und Huxford, T. (1999). Structural insights into NF- κ B/I κ B signaling. *Gene Ther Mol Biol*, **4**, 75-82.
- Gosh, P.K., Reddy, V.B., Swinscoe, J., Lebowitz, P. und Weissman, S.M. (1978). Heterogeneity and 5'-terminal structures of the late RNAs of simian virus 40. *J. Mol. Biol.*, **126**, 813-846.
- Gossen, M. und Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W. und Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, **268**, 1766-1769.
- Graef, I.A., Mermelstein, P.G., Stankunas, K., Neilson, J., Deisseroth, K., Tsien, R.W. und Crabtree, G.R. (1999). L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-Atc4 in hippocampal neurons. *Nature*, **401**, 703-710.
- Greene, L. und Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Sci. USA*, **73**, 2424-2428.
- Grunstein, M. (1997). Molecular model for telomeric heterochromatin in yeast. *Curr. Opin Cell Biol.*, **9**, 383-387.
- Hamaguchi, K. und Geiduschek, E.P. (1962). The effect of electrolytes and the stability of deoxyribonucleate helix. *JACS*, **84**, 1329-1337.
- Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 465-503.
- Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.

- Hanahan, D. (1985). Techniques for transforming of *E.coli*. DNA-cloning – A practical approach, IRL Press, Oxford, **1**, 109-135.
- Hanna-Rose, W. und Hansen, U. (1996). Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. Trends Genet., **12**, 229-234.
- He, X., Gerrero, R., Simmons, D., Park, R., Lin, C., Swanson, L. und Rosenfeld, M. (1991). Tst-1, a member of the POU domain gene family, binds the promoter of the gene encoding the cell surface adhesion molecule P0. Mol. Cell Biol., **11**, 1739-1744.
- Hebb, D.O. (1949). The organization of behaviour. Wiley, New York.
- Herdegen, T. (1996). Jun und Fos-Proteine: Spielwiese der Transkriptionskontrolle im Nervensystem. Futura **1/96**, 13-24.
- Herdegen, T. und Leah, J.D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. Brain Research Reviews, **28**, 370-490.
- Herdegen, T., Skene, P. Bähr, M. (1997). The c-Jun transcription factor – bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. Trends Neurosci., **20**, 227-231.
- Hirsch, M.R., Gaugler, L., Deagostini-Bazin, H., Bally-Cuif, L. und Goridis, C. (1990). Identification of positive and negative regulatory elements governing cell-type-specific expression of the neural cell adhesion molecule gene. Mol. Cell. Biol., **10**, 1959-1968.
- Holstege, F.C., Fiedler, U. und Timmers, H.T. (1997). Three transitions in RNA polymerase II transcription complex during initiation. EMBO J., **16**, 7468-7480.
- Hsu, W., Kerppola, T.K., Chen, P.L., Curran, T. und Chen-Kiang, S. (1994). Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. Mol. Cell Biol., **14**(1), 268-276.
- Ingham, P.W. (1985). Genetic control of the spatial pattern of selector gene expression in *Drosophila*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., **50**, 201-208.
- Johnson, O., Murphy, P., Prydz, H. und Kolsto, A.B. (1998). Interaction of the CNC-bZIP factor TCF11/LCR-F1/Nrf1 with MafG: binding-site selection and regulation of transcription. Nucleic Acids Res., **26**, 512-520.
- Johnson, P.F. und McKnight, S.L. (1989). Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. Annu. Rev. Biochem., **58**, 799-839.
- Kadonaga, J.T. (1998). Eukaryotic transcription: An interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. Cell, **92**, 307-313.
- Kadonaga, J.T. und Tjian, R. (1986). Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**(16), 5889-5893.

- Kaiser, K. und Meisterernst, M. (1996). The human general co-factors. *Trends Biochem. Sci.*, **21**(9), 342-345.
- Karin, M. und Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. *Annu. Rev. Immunol.*, **18**, 621-663.
- Kel, O.V., Romaschenko, A.G., Kel, A.E., Wingender, E. und Kolchanov, N.A. (1997). Composite regulatory elements: classification and description in the TRANSCompel database. *Mol. Biol.*, **31**, 498-512.
- Kelly-Spratt, K. (1998). Transfection of PC-12 cells: a model system for primary neuronal cells. *QIAGENews*, **4**, 3-4.
- Klebe, R.J. und Ruddle, F.H. (1969). Neuroblastoma: Cell Culture Analysis of a Differentiating Stem Cell System. Annual Meeting American Society for Cell Biology, 9th, 69a.
- Kliwer, S., Umesono, K., Heyman, R., Mangelsdorf, D., Dyck, J. und Evans, R. (1992). Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1448-1452.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 8125-8148.
- Lagrange, T., Kapandis, A.N., Tang, H., Reinberg, D. und Ebright, R.H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: Sequence-specific DNA binding by transcription factor TFIIB. *Genes Dev.*, **12**, 34-44.
- Lamprecht, R. (1999). CREB: a message to remember. *Cell Mol. Life Sci.*, **55**, 554-563.
- Latchman, D.S. (1995). Gene regulation: a eukaryotic perspective. Chapman and Hall, London, 1995.
- Lee, F.S., Peters, R.T., Dang, L.C. und Maniatis, T. (1998). MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and Ikappa B kinase beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**(16), 9319-9324.
- Makalowski, W. (1995). SINEs as a Genomic Scrap Yard: An Essay on Genomic Evolution. Kapitel 5 des Buches: The impact of SINEs on the host genome, R.G. Landes Company, Österreich.
- Malenka, R.C. (1994). Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP und LTD. *Cell*, **78**, 535-538.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Mattson, M.P. und Camandola, S. (2001). NF-kB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Clin. Inv.*, **107**, 247-254.

- Maxam, A.M. und Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.*, **65**, 499-560.
- May, M. (1999). Identifizierung des gehirnspezifischen Membranproteins 83-5 und seiner löslichen Isoform mittels molekularbiologischer und immunhistochemischer Methoden. Dissertation, TU Darmstadt, Fachbereich Biologie.
- Mayford, M., Bach, M.E., Huang, Y., Wang, L., Hawkins, R.D. und Kandel, E.R. (1996). Control of Memory Formation through regulated expression of a CaMKII Transgene. *Science*, **274**, 1678-1683.
- Mermod, N., Williams, T.J. und Tjian, R. (1988). Enhancer binding factors AP-4 and AP-1 act in concert to activate SV40 late transcription in vitro. *Nature*, **332**, 557-561.
- Meulia, T. und Diggelmann, H. (1990). Tissue-specific factors and Glucocorticoid Receptors present in nuclear extracts bind next to each other in the promoter region of mouse mammary tumor virus. *J. Mol. Biol.*, **216**, 859-872.
- Minol, K. (1997). Funktionsanalyse des α -Amylase-Promotors aus *Aspergillus oryzae* DSM 63303. Dissertation, TU Darmstadt, Fachbereich Biologie.
- Molnar, A. und Georgopoulos, K. (1994). The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 8292-8303.
- Momand, J., Zambetti G.P., Olson, D.C., George, D. und Levine, A.J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, **69**, 1237-1245.
- Mullis, K.B. und Faloona, F. (1987). Synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, **155**, 335-350.
- Mullis, K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.*, **262**, 56-65.
- Musti, A.M., Treier, M. und Bohmann, D. (1997). Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science*, **275**(5298), 400-402.
- Nagpal, S., Athanikar, J. und Chandraratna, R.A. (1995). Separation of transactivation and AP1 antagonism functions of retinoic acid receptor alpha. *J. Biol. Chem.*, **270**(2), 923-927.
- Nelson, H.C. (1995). Structure and function of DNA-binding proteins. *Curr. Op. Genet. Dev.*, **5**, 180-189.
- Nobile, C. und Pitzalis, S. (1999). Expression analysis of 21 transcripts physically anchored within the chromosomal region 10q24. *Genomics*, **62**, 86-89.

- Nobile, C., Hinemann, B., Scannapieco, P., Siebert, R., Zimbello, R., Perez-Tur, J., Sarafidou, T., Moschonas, N.K., French, L., Deloukas, P., Ciccodicola, A., Gesk, S., Poza, J.J., Lo Nigro, C., Seri, M., Schlegelberger, B., Rosenthal, A., Valle, G., Lopez de Munain, A., Tassinari, C.A. und Michelucci, R. (2002). Identification and characterization of a novel human brain-specific gene, homologous to *S. scrofa tmp83.5*, in the chromosome 10q24 critical region for temporal lobe epilepsy and spastic paraplegia. *Gene*, **282**, 87-94.
- Novina, C.D. und Roy, A.L. (1996). Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet.*, **12**, 351-355.
- Oberthür, A.M. (2002). Das gehirnspezifische Protein TMP 83.5: Isolierung und Bestimmung der zellulären Lokalisation. Dissertation, TU Darmstadt, Fachbereich Chemie.
- Ogasawara, A. (1999). `Photographic Memory` in Mice: a transgenic approach to elucidate the role of CREB as a Molecular Switch from Short-Term to Long-Term Memory in mammals. *bug journal*, **2**, 291-297.
- Ogbourne, S. und Antalis, T.M. (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J.*, **331**, 1-14.
- O'Neill, L.A.J. und Kaltschmidt, C. (1997). NF- κ B: a critical transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.*, **20**, 252-258.
- Pabo, C.O. und Sauer, R.T. (1992). Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 1053-1095.
- Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, **18**(49), 6853-6866.
- Palm, K., Belluardo, N., Metsis, M. und Timmusk, T. (1998). Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene. *J. Neurosci.*, **18**(4), 1280-1296.
- Perl, S. (1996). Das hirnspezifisch exprimierte Gen 83.5: Vervollständigung der genomischen Sequenz und Ermittlung des Transkriptionsstartpunktes. Diplomarbeit, TU Darmstadt, Fachbereich Chemie.
- Peterson, D., Schoch, S., Brinkmann, D.R. und Thiel G. (1995). The human Synapsin II gene promoter. *J. Biol. Chem.*, **270**, 24361-24369.
- Phillips, K. und Luisi, B. (2000). The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit. *J. Mol. Biol.*, **302**, 1023-1039.
- Promega Corporation (1999). Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System. Technical Manual, 2/99.
- Pugh, B.F. (2000). Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene*, **225**, 1-14.

- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. und Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector – New fast and sensitive tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 4878-4884.
- Rao, A., Luo, C. und Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.*, **15**, 707-747.
- Rauscher, F.J., Voulalas, P.J., Franza, B.R. und Curran, T. (1988). Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes Dev.*, **2**(21B), 1687-1699.
- Raynal, J., Dugast, C., Le Van Thai, A. und Weber, M. (1998). Winged helix hepatocyte nuclear factor 3 and POU-domain protein Brn-2/N-Oct-3 bind overlapping sites on the neuronal promoter of human aromatic L-amino acid decarboxylase gene. *Mol. Brain Research*, **56**, 227-237.
- Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 327-335.
- Ron, D. und Habener, J.F. (1992). CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.*, **6**, 439-453.
- Rose, J.K., Buonocore, L. und Whitt, M.A. (1991). A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *BioTechniques*, **10**, 520-525.
- Revzin, A. (1993). Footprinting of nucleic acid-protein complexes. Academic Press, Inc., San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**(12), 5463-5467.
- Savoldi, G., Fenaroli, A., Ferrari, F., Rigaud, G., Alberini, A. und Di Lorenzo, D. (1997). The glucocorticoid receptor regulates the binding of C/EPBbeta on the alpha-1-acid glycoprotein promoter in vivo. *DNA Cell Biol.*, **16**(12), 1467-1476.
- Schepelmann, S. (1996). Charakterisierung des hirnspezifischen Transkripts 83-5. Vom expressed sequence tag zum Protein. Dissertation, TU Darmstadt, Fachbereich Biologie.
- Schoenherr, C.J., Paquette, A.J. und Anderson, D.J. (1996). Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9881-9886.
- Schoenherr, C.J. und Anderson, D.J. (1995). The Neuron-Restrictive Silencer Factor (NRSF): A Coordinate Repressor of Multiple Neuron-Specific Genes. *Science*, **267**, 1360-1363.

- Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M.M. et al. (1989). Rapid detection of octamer binding protein with „mini-extracts“, prepared from a small number of cells. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 6419.
- Schreiber, E., Tobler, A., Malipiero, U., Schaffner, W. und Fontana, A. (1993). cDNA cloning of human N-Oct-3, a nervous-system specific POU domain transcription factor binding to the octamer DNA motif. *Nucleic Acid Res.*, **21**, 253-258.
- Seri, M., Cusano, R., Forabosco, P., Cinti, R., Caroli, F., Picco, P., Brescia Morra, V., De Michele, G. und Lerone, M. (1999). Genetic mapping to 10q23.3-q24.2, in a large Italian pedigree, of a new syndrome showing bilateral cataracts, gastroesophageal reflux, and spastic paraparesis with amyotrophy. *Am. J. Hum. Genet.*, **64**, 586-593.
- Shi, Y., Lee, J.S. und Galvin, K.M. (1997). Everthing you ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochim. Biophys. Acta*, **1332**, F49-F66.
- Shors, T.J. und Matzel, L.D. (1997). Long-term potentiation: what's learning got to do with it? *Behav. Brain Sci.*, **20**, 597-655.
- Singhal, A. und Huang, L. (1994). Gene transfer in mammalian cells using liposomes as carriers. *Gene Therapeutics. Methods and Applications of direct Gene Transfer*, Birkhäuser, Boston, 118-142.
- Skala, H., Porteu, A., Thomas, M., Szajnert, M., Okazawa, H., Kahn, A. und Phan-Dinh-Tuy, F. (1998). Upstream elements involved in vitro in activation of the brain-specific rat Aldolase C gene. *J. Biol. Chem.*, **273**, 31806-31814.
- Smale, S.T. (1994). Core promoter architecture for eukaryotic protein-coding genes. In *Transcription: Mechanisms and regulation* (ed. Conaway, R.C. and Conaway, J.W.), Raven Press, New York, 63-81.
- Smale, S.T. (1997). Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1351**, 73-88.
- Smeal, T., Angel, P., Mee, J. und Kari, M. (1989). Different requirements for formation of Jun:Jun and Jun:Fos complexes. *Genes Dev.*, **3**(12B), 2091-2100.
- Stuempfle, K.J., Koptides, M., Karinch, A.M. und Floros, J. (1996). Preparation of transcriptionally active nuclear extracts from mammalian tissues. *Biotechniques*, **21**(1), 48-50.
- Swirnoff, A.H. und Milbrandt, J. (1995). DNA-binding specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors. *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 2275-2287.
- Thanos, D. und Maniatis, T. (1995). Virus induction of human IFN β gene requires the assembly of an enhanceosome. *Cell*, **29**, 1091-1100.
- Teifel, M. (1996). Transfektion vaskulärer Endothelzellen – Optimierung der Transfektion und Anwendung zur heterologen Genexpression. Dissertation, TU Darmstadt, Fachbereich Biologie.

- Teifel, M. und Friedl, P. (1995). New lipid mixture for efficient lipid-mediated transfection of BHK cells. *BioTechniques*, **19**, 79-82.
- Terada, Y., Okado, T., Inoshita, S., Hanada, S., Kuwahara, M., Sasaki, S., Yamamoto, T. und Marmo, F. (2001). Glucocorticoids stimulate p21(CIP1) in mesangial cells and in anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int.*, **59**(5), 1706-1716.
- Thiel, G., Lietz, M. und Cramer, M. (1998). Biological activity and molecular structure of RE-1 Silencing Transcription Factor (REST), a repressor of neuronal genes. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26891-26899.
- Thiel, G., Lietz, M. und Leitner, M. (1999). Regulation of neuronal gene expression. *Naturwissenschaften*, **86**, 1-7.
- Triezenberg, S.J. (1995). Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**, 190-196.
- Tseng, Y.T., Stabila, J.P., Nguyen, T.T., McGonnigal, B.G., Waschek, J.A. und Padbury, J.F. (2001). A novel glucocorticoid regulatory unit mediates the hormone responsiveness of the beta1-adrenergic receptor gene. *Mol. Cell Endocrinol.*, **181**(1-2), 165-178.
- Tsien, J.Z. (2000). Enhancing the link between Hebb's coincidence detection and memory formation. *Curr Opin Neurobiol.*, **10**(2).
- Ubeda, M., Wang, X.Z., Zinszner, H., Wu, I., Habener, J.F. und Ron, D. (1996). Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1479-1489.
- Verrijzer, C.P. et al. (1995). Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA Polymerase II. *Cell*, **81**, 1115-1125.
- Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 615-619.
- Wagner, B. (1995). The transcriptional regulation of the neuronal-specific human Tau gene. *The Harvard Brain. Harvard's Undergraduate Neuroscience Magazine*, **2**(1).
- Wang, W.W. und Howells, R.D. (1994). Sequence of the 5'-flanking region of the rat c-fos proto-oncogene. *Gene*, **143**(2), 261-264.
- Wang, M.M., Tsai, R., Schrader, K. und Reed, R. (1993). Genes encoding components of the olfactory signal transduction cascade contain a DNA binding site that may direct neuronal expression. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 5805-5813.
- Weiler-Güttler, H., Zinke, H., Schepelmann, S., Seehaus, B. and Gassen, H.G. (1993). Subtractive Cloning of Genes selectively Expressed at the Blood-Brain-Barrier. In *The Blood Brain barrier*, Pardridge, W.M. (ed.), pp 323-338, Raven Press, New York.
- Werner, T. (1999). Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. *Mammalian Genome*, **10**, 168-175.

- Whiteside, S.T. und Israel, A. (1997). I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin. Cancer Biol.*, **8**(2), 75-82.
- Wingender, E., Diete, P., Karas, H. und Knüppel, R. (1996). TRANSFAC: A database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 238-241.
- Workman, J.L. und Kingston, R.E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 545-579.
- You, Y, Chen, C.Y. und Shyu, A.B. (1992). U-rich sequence-binding proteins (URBPs) interacting with a 20-nucleotide U-rich sequence in the 3' untranslated region of c-fos mRNA may be involved in the first step of c-fos mRNA degradation. *Mol. Cell Biol.*, **12**(7), 2931-2940.
- Zawel, L. und Reinberg, D. (1995). Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Ann. Rev. Biochem.* **64**, 533-561.
- Zhang, W., Zhang, J., Kornuc, M., Kwan, K., Frank, R. und Nimer, S.D. (1995). Molecular cloning and characterization of NF-IL3A, a transcriptional activator of the human interleukin-3 promoter. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 6055-6063.

www.cbil.upenn.edu/MTIR/HomePage.html

Lopez, L. und Fickett, J.W.

Muscle-Specific Regulation of Transcription: A Catalog of Regulatory Elements.

7 Anhang

7.1 Sequenz des Gens 83.5

Die Nukleinsäuresequenzen sind in den Datenbanken EMBO, GenBank und DDBJ unter den angegebenen Zugangsnummern abgelegt (Gen 83.5: Accession-Nr. X99893; mRNA tmp 83.5: Accession-Nr. X89480; mRNA sp 83.5: Accession-Nr. Y11026;)

	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	GGATCCTTAA	CCCACTGAAC	GAGGTCAGGG	ATCGAACCCA	CAACCTCATG	GTTCTAGTC	GGATTCTTTT	CCACTGCGCC	80
81	ACGATGGGAA	CTCCTCAGCT	TACGTTCTTA	TATCGTGATT	TATCACAGCC	CCGGTCCCAG	AGGGTCCTTG	ATTCAGCAGA	160
161	CGGAGCAGCT	TGTCACGTGG	TCTGGGTCTT	ACCCGCCTCC	TTGGGTAGAT	TCCGTTTCTC	TGATTCTCTG	GTTTGGGGGG	240
241	GGTGCTTTAA	TTTTGTCTCC	TCTTCTCTGT	CAAGTTTGAA	ACTGAAATGG	GGATGCCTAA	GGTAGCTGTT	AAAGGTCGCT	320
321	CTCCAAGGAC	ATGAAAACCT	TGTAGTTTCA	GCCTTTAGAA	GTTTAAATAA	GATTAATGGT	TTCCCTGGAA	AACTGGAGGG	400
401	GGCAGATGTC	AGAAACAGAG	TCAGCTCTGC	GTCAGGATTT	GCCCCCTTGT	GAAACAATGG	TCCTTATTTG	TCTCTCTTTA	480
481	GTATGGCTAT	TTTTAAAAAT	GCACAACCTC	AACAATTATC	AGCCTATGAC	CAATTGGAAA	CAATGGACGC	TGTGAAAAAC	560
561	CTTTATTACG	GCCTTCTGTG	CGTGATGTAT	TCCCAGAAGG	ACAGGCTCGA	TTCGGCTGGG	GCTGGCCACG	TGCCGCCTGA	640
641	AGCTTCACAG	AACTGGTACA	ACGCAGGTTT	TGTGAGGAGC	TGCATGGCCA	GCTTCCCAAG	GGCAAGTCCC	TCAGCAGAAA	720
721	GAGCCAGGCC	CCAGCCTTGG	CACTTCCAAA	TGCTCAGTGA	CCTTCCTGCA	CACCTGCCAG	GGGACATTAC	CCCTGCCTGC	800
801	TTTGTCTCTT	AACTGGAGAT	CGGGCCCTGG	GGCTGTCCAG	CACCTAAGA	CTGGCTTCAG	ACCAGAGAAT	TATCTTGACC	880
881	TGATGGAAAA	TTCCGGGGCT	AGGTCCTTGG	TCCGGTCCAG	TTCTCGTGTA	ATCGGGTCTA	GCTGATGTTA	GAACCTGGAC	960
961	CTGGATCCAG	GGCCCGGTGG	GTGTCTGGAG	TTAAGTTTCA	CCTGTGGAAT	GTCTCCATAC	AGAAAACGAG	GCTGTCCGTT	1040
1041	GATTTGCTCG	AAGACTCTTT	CCCTCCAAAG	TTAAGTTTCA	GATGATTCAT	GAAACGTTTC	GCCTGGCGAA	ATCATTTGTA	1120
1121	AAATCTCGTT	CACTGGTGAA	TCACACTGGG	GTTTGCCATT	GATCTGGTCC	GCTTGGTATG	TCGCAGAGAA	TTTCATAGTA	1200
1201	TTGTTATTTT	TCAAGGTCTG	AATGAATGTT	CCCTTGCTTT	CAGCTGATGT	TTTTCAAGTT	TCCTTTGTAG	ACCGACCTTC	1280
1281	TGAAAAAGAA	TCCCAAATGC	CTGAAAAGTT	TCTTTAAAAA	AGAAAAAGA	AAAAGTGT	AGACCGTTAT	CTATAAATAT	1360
1361	ACCGTATTTT	TAATTTTGTG	TAATTGTACA	TTTCATGAAA	GGCTGTCAGC	TTCAAAGAGG	AAGCGAAGAG	GAGCTAACAC	1440
1441	ATGTCTAGAA	AGAATTGTCT	CATTAAAGAA	TGTGGATCTA	TTGATGAGTC	CTGGGTCTGT	CCTCTTGGTG	ATCATTTTCT	1520
1521	CCAATTACAG	ACAAGATCCT	GGGGAGCAGG	GGAAAAAGGT	GCCTTTTCTA	GGGCTTCTGT	CTCTCTGGTG	AGTACCTGGC	1600
1601	TCAGACACAG	GCTCCCTCCA	ACCCAGAAAG	TCATGAGCAG	ATCTAAAGAG	GGCTTCAGAG	TGCCCCCTTT	TCTTGGAACC	1680
1681	AAACAGGTTG	AAAATCTGAG	AACATAATTG	TGGAGCTGCT	GGAGCCGAGC	TCAGCGTGAT	AAACACACCC	CCACCCCGCG	1760
1761	TGCCCCCTCT	TGCTCTCAG	CAGCTCTCCC	CATCAGGTTT	TGAGATGGAG	TCTGAGGACC	ACATGTGCCA	TCCAAAACCTG	1840
1841	AAGGTCCTCG	CTCCTCAAAG	GGGCTCCCTG	TGTTCTGGGA	ACCACTCCTT	GCACTCTCCC	CTCCAAGCCT	AGGGGGCTGT	1920
1921	GATGCTCTGC	CCATCTTACT	CGGTGGTCCC	CTGGGGGAAA	TTTTTTTTTT	TCTTTTTTGC	TATTTCTTGC	GGGTCCCGCG	2000
2001	GCATATGGAG	GTTCCAGGCG	TAGGGGTGCA	ATAGGAGCTG	TAGTGCCTCG	CCTACACCAC	AGCCACAGCA	ACGTGGGATC	2080
2081	CGAGCCCGCT	CTGCAACCTA	CACCACAGCT	CACGGCAACG	CCAGATCGTT	AACCCACTGA	GCAAGGGCAG	GGACCGAACC	2160
2161	CGCAACCTCG	TGGTTCCTAG	TCGGATTTCAT	TAACCACTGC	CCCACGACGG	GAACCTCCCC	TGGGGGAAAT	TTTTATACAT	2240
2241	AGTCTCTTTC	TAGCCCTCTG	CCTAACATATA	ACTAATTGAA	TACATCCCTC	ATTTCTGTGT	GAGCCCTCTG	CTGATAACAG	2320
2321	TTCATTTCTA	ACACAAGGAC	AGAGAACGCC	CGCTAATCAA	AGACTGTCTT	ATGAGTTTGA	CCAGATAGAG	ATTTTAGGAT	2400
2401	GTGTTTGAG	TTTTGTGTGT	CATATCAGGG	AAGGGTGTGG	GACCATGTTT	TTGTTTGTGT	TTGTTTGTGT	TTTTTTGCCT	2480
2481	TGCCCAAGGC	ATGTGGAAT	TCCCTGCCCA	GGGATCGAAC	TTGCACCACC	ACAGTACCTG	GAGCCACAAC	AGTGACAATG	2560
2561	CGGATCTCTT	ATAGCCCTCG	GCCACAAGGG	AACCTCTGGG	ACGACGTTTT	TAAAAACACT	TAGCTGTAA	CGGTAATGAT	2640
2641	TTAACACATG	CAGCTATTTT	GTGTTATATG	TACAGGGTCA	AGGTTTTCATG	ACGTTTTTGC	CCTTCTCTGT	CACTGGTACC	2720
2721	TAAAGGATGA	GCTCCAGTGG	TGCAAGGGTG	TGATGCTTGG	ATGTGTGAGT	TGTCAAGAT	GGGGTGCCTT	ATGCCAAAAC	2800
2801	AACAAAAAAA	CCACTCTGAC	GTGTCAGGGT	TCTTACAGGA	GAAAGACCTA	TTTCTTGTCC	ACATACATAT	TTCTCTCTTT	2880
2881	TTATCTGGAA	GCCCTCCCAT	CCCACCTCTA	GTACGAGTGG	GCCTGATGGC	GCAGCGGCTG	TGGGGAACCT	TGCTATTTCT	2960
2961	GTGGCAGAGG	GAAACAGTGT	GACAAATCAC	ATGCCAGCTC	TTAGAACCAC	CCAGCAGTGA	CACATCACTT	CCACTCACAT	3040
3041	GTCACTGGCC	AGAGCAACTC	ACGGAGCTGC	CCCTAACTTC	ACAGTAAGGA	CGAAATGACC	TAAAGATGTC	TGTTGGGTCC	3120
3121	CACCAATGAC	TCTCATATGT	GACATTTCATA	GATGGGGAAG	TGACCAGAAC	CCTTCTGTCT	GTTTTCACAC	TGTCCTTCAT	3200
3201	CACCTGCTTC	TTACTGATT	TTTACTTTT	CTTTGTAGGT	ATCACTTGCA	GCATATGGAA	GTCGAATAGG	GGTCGAATCG	3280
3281	GAGCTACAGC	TGCCGGCTGT	TGCCATAACT	ACAGCAACGC	AGGATCCGCG	CTGTATCTGC	CACCTACACC	ACAGTTTATG	3360
3361	GCAGCGCCGG	ATCTTTGACC	CACCTAGTGA	GGCCAGGGAT	CAAACCCGCA	TCTCTGACCC	TATTTAGGTT	CCTTAACCTA	3440
3441	CTAAACCCAC	ACGGGAACCT	TTCATATGCA	TCTTAAATGC	CATCTCCACG	ACAGTCTGAA	GCAGCTGCCT	CCTGGTCACT	3520
3521	CCAGTCCCTC	TTGCTTCTCT	CCCCACTTGC	TCTTCTATAG	TCAATTTCCC	TGTTTCTTTT	TTTAAATCTT	TTTTTTATTT	3600
3601	TTTTGTCTTT	TCTAGGGCCA	CTCCCGCAGC	ATATGGAGGT	TCCCAGGCTA	GGGGTCCAAT	CGGAGCTGTA	GCCGATGGCC	3680
3681	TACGCCAGAG	CCACAGCAAC	TGGGGAATTG	AGCCGCTCT	GCGACCTACA	CCACAGCTCA	TGCAACGCC	AGATCCTTAA	3760
3761	CCCACTGAGC	GAGGCCCGGG	ATTGAACCCG	AAACCTCATG	GTTCTAGTCT	AGATTGGTTA	ACCCTGACAC	CACGATGGGG	3840
3841	ACTCCGATTT	TCATTTGTTC	TGATGGCTGT	TGGTCTGCAC	TCCCTGAATA	CCTTCCCTAA	GAGTTGGGGC	CTCATTTGTC	3920
3921	TTTCATCACA	AGCCCAGGAC	AGTGCCAGG	ATAATGCTTG	GCCTGTAGAC	CAAGGGTTAA	AAAGGGTTGT	TGAGTAAATG	4000
4001	AACAAATACA	CTCAATGAAA	CCACCAAATT	ATTGGTTTAA	TCTTGTGTGT	TGTTAAACGT	GAGACTGCAA	TTCCTCCCTT	4080
4081	GTTTTATTTT	TATTTGTTTA	ATTATTTACT	TTATAGGGCT	GCACCTGCAG	CATATGGAGG	TTCCAGGCTT	AGGGGTCCAT	4160
4161	TTGGAAGTGT	AGCCACCGCG	CTACGCCACA	GCCACAGCCA	CACGGGATCC	TAAACCCACT	GAGCAAGGCC	AGGAATTGAA	4240
4241	CTGCAACCT	CATGGTTCTT	AGTCGGATTC	GTTTCTGTCT	TGTCACGATG	GGAACCTCTC	CTCCCTTGTT	TAAAGATGTC	4320
4321	AACTCCCGGA	GTTCCCACTG	TGACTCAGTG	GTTAACAGAA	CCCGACTAGG	AACCATGAGG	TGTGCAAGTT	GATCCCTGGC	4400
4401	CTCGCTTTCC	TGTGGCTGTG	GTGTAGGCCA	GGGGCTACAG	CTCCAATTGG	ACCCCTAGCC	TGGGAACCTC	CATACGCTGC	4480
4481	AGGTGCGGCC	CTAGAAAAATG	CAAAAAGTGA	ATAAAATAGG	AAGCAACTTC	CTAAAGAGAG	GCTCTTAAAG	AGTATAAGGC	4560
4561	CCCCCTTGTC	AATGCTTCTT	CCACCAAAAA	TGTGCAAAAC	GAAGGAGGGT	GAGGCTGCAT	TCAAGGGCGT	GCACCTCTCC	4640
4641	TGGCAGCTAT	AGCCGTGCCT	CCAACACAGA	GCAGGCTGCA	CCCCCACCT	CCAAGGCTTC	CTACATCGAC	ACAGGTAATG	4720
4721	TGTTGACTCC	ATCACTGCGG	GATGGTGGGC	AGTGCCACTG	CCTGGCAGCT	GGGGATGGAG	TGGCCAACTA	AGCCTCACTT	4800
4801	CGCCTGTGTA	ACCCATTGTC	TCTAAAGAGC	AGCTGGCTGC	AGAAGCCACC	AAGGTCTCGG	GCCAGCTGTG	GGCTCTTTGC	4880
4881	TGAGATGAAG	GGGTAACCAT	GGAAGAGGCT	TGAAAAGTCA	ATAAGGACCA	AAAATGACTG	CGAAGTGGTT	AGATGACCCG	4960
4961	GGGCCTTCCA	TGGTGGCCAT	GACACAGGAG	ACCTTCTTCC	CCGGGGGCTG	GGCCAAAGAC	TCAGCTACTC	CCCTGACCAT	5040
5041	AAATGGCTTG	GCCAGCATTC	TCTTGGAGCC	ACCTCTTGCT	CTGTCACCCT	TGCTCTCCCA	GCTGGATGGT	CCTACAAATG	5120

5121 CAAGACACAC GCCAACAACA CCAGCAAGAA AGGAACCTGCG CAAGGGCAGT GTTTGGAGAA GGCTCCTGGG AGGCTGTGCG 5200
 5201 AAATGGTGAG TGAGAGCTTG CATCTTTCCCT CTGCCCCAACC TTCAATTTCTC ACCATAAAAA ACAATCCCCA GGCTTTTAAA 5280
 5281 GCTCACTCTC CCATTCAAAT ATAAATGTAC CCTTGATGCA AGGAAGTTAA GGAGCTTGGT TTTTAAAT ATTTTCCCAT 5360
 5361 ATGCAAAATA CTAATTCTCA TCTAATATTT GCTGACCCCA TCTCATATTT TAATATTAAG CTTTGTGTTT TAGCCCCCA 5440
 5441 CGTACAAAGG TGAAGAGTGA ATATTTTCAGC TAAATTCCTT TCCCAGTCAA AGCAATGGGT CAGATCAATG CCTTTCTTCT 5520
 5521 TATTTGTTCA GTGTGCCTTT GGCTACATGA TCAGCCACAG AGATATTGAG AAGTTGCATC AGAACTACT CACCTTTCTA 5600
 5601 ACTGACTAGT GATACGTGTT TGGTTGTGAC TCAATTGCAT GAAATTTGCT AAGTTTAGAA AGGCTGCTGG GATTCCTTTA 5680
 5681 TTAAAGAGAT TATGAAAAGT GCAGGTGTTG GAGTTGAGTG ATCAAATCCA ACCGAGCCTC TCCCACTTCC CATCTGGGGA 5760
 5761 CCTTGAGAGA CCTGTCTGGG TCACAGTCCC TTCACCTGTG AGGTAGAGAT GAGAGTGTTT CCCTTACAGG GACTTTGTGA 5840
 5841 GTGCAGAGTG TGACACACAG CATGCCCTTCA ATTACAGTGA GTAGTTATCC GTCCCCCTTC CCATCACAAA CAGCAAACTC 5920
 5921 ATAAATGAGT ATCCCCAGCC ACTGAGATCC TCATGTGGCT TCAGAAGCTG TATATAGGTG TTCCCCCTTG GGCCCCAGTG 6000
 6001 TGAACGAATC CAACCTAGGA ACATGAGGTT GCAGGTTCAA TCCCTGGCCT TGCTCAGTGG GTTAAAGATC TGGTGTGACC 6080
 6081 GTGAGCTGTG GTGAAAAGTTG CAGACATGGC TCGGATCCAG CGTTGCTGTG AGCTGTGGTG TAGTGTGCGA ACGAGGCTTG 6160
 6161 GATCCCACCT TGCTGTGGCT GTGGTGTAGG CCAGTGCGTA CAGCTCTGAT TAGACCCCTA GCCTGGGAAC CTCCATATGC 6240
 6241 CATGGGTGAG CCTGTAGAAA AGGCAAAAAA AAACAAAAAC AAAAAACAAA AAACCAACA ACAAACAAAA 6320
 6321 CCATTATGTA GACCTCACAT AGTGCCTGTA CCAAAATTCTA GTACTTTGAA TATTGCTAAT CCACGTCAGC ATCTCCATCT 6400
 6401 AACAAAGTCT TCTCAGGGGC TTCCCTGGGC CTGCTCTGCT GCTGGCCAGG CCATGAAGAA GACAGACCT CGCATGCATA 6480
 6481 TTTTATAATT TGGGAAGAGC TGCCACAGAT ACTTTTGGG GGAGGTGCTT ATCTTATGAG ATGGCAGGCA GTAATAGTAT 6560
 5561 CCCATTTTG AGGATGAAAA AACTGCCCTT GGAGAGAGAT AGATTGTTTG TAAGGAAATG GAGACAGAG AGCTGGAGTC 6640
 6641 ACTTTTCCCA GGCCGCACAG CTGAAGTGGC TGAGTCTGGA CTTGAAGTCT GGACTTGAAC TGAGATCAGG AGACTCCAAG 6720
 6721 CCCAGGGATG CCTTGCCCTT CCTGCTGCCT TTCTAAAGAA CACTGCCTCA GATTCTTCTC CACCCATATT TTCATGATTT 6800
 6801 TTTTTTTTTT CCTCTGTAAG AGCACGTAGT GTGTTTCTGC AAGATATGAA TGCCTTTCTG AAATCGGCCA AAATCTTTGT 6880
 6881 CCACTCAATG TGTATAACA GCACCTGCAA TGGCCCACTT GTTGCTGCTC TTGCTTCTG CTGTCCCTCC AAAGGAGGCC 6960
 6961 TTTGTCTGCG CCCTGCTGAC ATCAGTACCC AGGCTCACTG ATGAGATAAG GCTTTGGGCA GCTGTGTTTG ATGCAGTGAC 7040
 7041 CACACAGGGT CCTCTGGGAG CTGCGTTGGC ATTAGCATGA GGAGCAGTGG TTAGGTCTCT GGAACAAAGT GACCCTGATC 7120
 7121 TGAGGTGGTC CAGCTGTCCC TCTTGTCTTA ATACTATCTA GGAAGAGGAG GTGGAAGTGT CTGTGAGCCT GGGGGCTCTG 7200
 7201 GTTATTACAG AGAAAGTAGA GGAGATGCGA GGAAGCTGTG AATGTGTAGT AAAAAAGCTG TCACCAAAAG GAAGGAGGTC 7280
 7281 TGGTGACAGC TAGTGAGCTT GGGAAACCCA TTCAAATTCT TGCGTTGATT TTCTTCCAG TAAAGTGATG GCCCTGTGTT 7360
 7361 CTAAGAGACA GAGAAGATAA CAGTTGCCAT GGAAGCATGC TGGCTGGCTG GGCCATCCTA ATTGGAAGAC ATAGTCTCTG 7440
 7441 GGGCAGGGGG TACAGGATGG TAGGTGCTTA AAACATTTCT GTCCCCAAAA GAGTTTCTCA CGTATTAAAC TGTCTGAATT 7520
 7521 CCCACTCCC AGTAAGCCAG CTAAAGTATG TGTTCATCA GTTTTGCCTA TATCGGAGT GTCTCCTCTA GAACCATCTT 7600
 7601 TCAGGTTGGT TTGGAGTCAC ATGGACCAGT CTATTTTAAAG AGATGAGCTC TAACGGTTCT CATTGTGCTA TGAGGCAATT 7680
 7681 TCTCAGAGGT CCCTGGGCTT CTGTTTCTTC TTTTGTGTTT TTTTGTGTTG TTGTTGTTG TTGTTGTTT GCTTTTTTAG 7760
 7761 GACCCGACCG GCAGCATATG GAATTTTCCA GGCTAGGCAT CAAATCGGG CTGCAACCGC TTGTCTACCC CACAGTCACA 7840
 7841 GCAACGCTGG ATCTGAGCCA CGTCTGCAAC CTACACACAA GGGCATCGCG ATGCCAGATC CTTGACCCAC TGATCAGGCG 7920
 7921 CAGGGATCAA ACCTGCGTCC TCATGGATAT TAGTCGATT CGTTTCCACT GAGCCGAGC AGGAACCTCC AAGTTTCTCT 8000
 8001 TTCTTTACAT GGCACTTTTG AGATAGATGA TGTGAGAGC ACTTCAGGCC TGAAATGTTA GGATCTTTT GGATTCTCAA 8080
 8081 ACCCTTCCCA ATCTTCCCAT TGTGGGGTA ACATTAAAT TTAACACTTA GCAACACCTT GGCTTCTAGA GCGACACAA 8160
 8161 AGGGTCGTGG GAGCTTCCAG GAACATCAG AGCTGGAGTT TAAGTCAAG TGTGGGGAG CAGGGGCTGG GGTCTCTCC 8240
 8241 CAGGAGTGAG TTGCCGGAG AGGTGTTT TTGGAACCCC TGGGGATCTT ATCTCCACC CTAAGCAGAA AATGCCATCC 8320
 8321 TATCACACGA TTCCCTCCT GAAAGGAATT CCAGGAAAAA AAAAAAGCAA TTTTAGAC TCTGCTGCC TTCTAGTAAT 8400
 8401 AATTTTGTGT CCATGTTGTG TCAGGACCCC TCAGGCAATA GCTTCACTGG CTGGTCTTTT AATCCAGCCC TGCTGTTGA 8480
 8481 GGATCTGGGA GGACAGCAGG GCGGAGACCA CCTGTATGCC GAGGAGGAA CTCCTGACCT CGGAGCCCGC GCCTCCCTG 8560
 8561 CCTTCTCTGG AGCCAAGACT GGGTGGGGAG GCGGGGACCG ATGGAGCCTG TGGGGTGGT AAATTCTCTT GGAATCCACG 8640
 8641 GGGGTCACTG ATGTGTGCTG GATTGGTTAG GGGCTGCTG GACCATCCCC AGCACTGTA TGTTCCTTC TCTCTCTAG 8720
 8721 AGTTTTTTCAC TGAACCTCAC GCTCCCCGCC AACACAGTGA GTACCGTGGT CCCCATTCAC CAGGCAGCTC AGCCAAGAGC 8800
 8801 GTGTCAGAGT TTACCAGG CCTCCAGAAC ACCGTGGTTT AAAGCTCATG TAGAAAGAGA CTTAACACAG GTTTCAAAGG 8880
 8881 CACCCTGAAG GAGTTCCCAT CGTGGCTCAG CAGAAACGAA TCCGACTAGC AACCATGAGG TTGTGGGTTG GATCCCTGGC 8960
 8961 CTCGATCAGT GGGTTAAGGA TCCGGCATG CCGTAAGCTG TGATGTAGGT CGCAGACGCA GCTTGGATCT GGCATTGCTG 9040
 9041 TGCTCTGCTC ATAGGCCAGC AGTTACAGT CCAATTGGAC CCTACCTCTG GGAACCTCCA TATGCTTCCC ACAACGAAGG 9120
 9121 CACCATGAAG AGTTGGGAGA GTGCCAAAAG AAATATTTTC ACTTCTAAG ATTATCAATA TACCTTTTGA AAGGAAAGT 9200
 9201 AGCAAAAAAC CAAAACATTG AATTGCTATC CGCAGAAAAC ACTGGGGGCC ACTCCTTCTA GTCTCTTTT AGTGAACATC 9280
 9281 AGTGTGCTG TTTGTGTCT TTGTACCATA GTTTCTTCC TCTACCTATA ATTTGGTATG ATAAAGGTTT CCCATCAGC 9360
 9361 TTTATAACCA TAGCTGAGAA TAGTCACATG ATATTTCTTC AAGTGAAAT TTTCTTTCAA TGATTATCA ATTAGGAACA 9440
 9441 GACACAGGTA GAGATAAATC TTTGTCGGA CTTGAGATGA TTTCTTGA ATGTAGTCTA GAAGCAGAA TATTAGTCA 9520
 9521 ATAAGAAAGGA ATATTTTATG ACTCTGGATT ATGATACTTA GTTGTGAGTC CAAATGAGCA TTTTCTTTT TTTTTTTGG 9600
 9601 GGGAGGAGGC TTAGGGCCAC ACCTGTGGCA TATGGAGGTG CCACAGGCTA GGGATCTAAT CGGAGCTACA GCTGCCAACC 9680
 9681 TATGCCACAG CCACAGCCAC ATGGGATCCG AGCTGCATCT GTGCTACATA CCATGTCTCA TGGAACAGCC AGATCCTTAA 9760
 9761 CCCACTGTAT GAGCCAGG ATCGAACCTG CGTCTCATG GATGCTAGTC AGATTCTACT CCACTGAGCC ACGATGGGA 9840
 9841 CTCCCCAGT AGAGATTTTC AGCTGCTGAT GGTGGAGAT TTTAATCCAG AATTGATCCT CTATCTTCTA TCGTCATGTT 9920
 9921 GTGTAAAGAC AACACTTACG CCAGGATTGT TTTCTGACCA GAAGGGCTGC CATGATGGAG CTAGGCATTT TCCTGGCCCA 10000
 10001 GTTTTGGTTG GTTTTGGTTG TGCCAAATTT TCCTAATAAA TTGTGTAGCC ATTCAAAAAG AATAAATGTA ACCTGCCAAG 10080
 10081 AAAGAGGACG CCTAAGCCAG TGCTCATGTT TGCTGTAAC TGGGGACATC TTTCTGGAGG CACAGCACAG AAAGTAGGA 10160
 10161 GGCTTCTGGT GCCACACTG GCTGCCCTCA GGTCTGTCCC CTGACTCTGC AGCCCCCTGT CGCCCCCTCT GGTGCTTCCC 10240
 10241 TGTCTTCTGA ACCTCCCCGA CTCGCTCTGC TCCCTACTTC AGCCTCTGCC TGTCTCTGCA GACAACTCCC CCGTCTCTCT 10320
 10321 CTTACTCTGT CAAATCTTTT TACATTGGTC ACTTCTCTT CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTAGGGCCGC 10400
 10401 ACCACGGCA TACGGAGGTT CCCAGGCTAG GGGTCTAATC AGAGCTGTAG CCACCTGGCT ACACAGAGC CACAGCAATG 10480
 10481 CCGGATCTGA GCTGCATCTG CAACCTACAC CACAGCTCAC AGCAATCTGT GATCCTTAAC CCACGAGCA AGGCAGGGA 10560
 10561 TCGAACCAGC AACCTCATGG TTCCTAGTCA GATTCGTTAA CCACTGGGCC ACGATGGGAA CTCCTAAAT GGTCACTTCT 10640
 10641 GGAACCTTCT CCCGGCTGCT CAAAGCTAAC AGGTCTATAG AGACTCAGG TTCTGTGCTA TCTGGCTG GCCATCCTA 10720
 10721 TGAGGGTAACT TCAGGGAAGC AAGAAGCCTT GCATGGGGCA GTGGGGGGCA GTGGGGTGAG ACGGAGGCC TTATGCGCTG 10800
 10801 GTGATGACTT GAGGAGCCTT TCCTTGTTTA AGAGCGGATT TCTCTGAGAA CGGCCCTTC TCCTTTGAG CTTCTGCAGG 10880
 10881 GCCACAATCA TCCTAGTCTG CCTGGGACTA TCTGGCTTTA GCCCTGAGTG CCTCACGACC TCAGCAACTG CTCTGAAAA 10960
 10961 CCGGGGCTGT TGGCCACCCA ACATGGCAGC TCCGTTTCTG TCACGTAACC CTCCCTTGT GGTGCAGCTG GATGACTGGA 11040
 11041 CATGCCCCCG CCCTGGGAAG CAGGACAACA TGGACATAGG GCTCATCAGA GCTTCTCTGC AGGGAGGTTG GAACAGGACT 11120
 11121 CCCTAGGCAA GTCACTCCCT GCTGGGCCAT ACCGAATAGT CAAATAGAAA AACTGGGTTT AAAAAAAA AAAGAAGGTT 11200
 11201 GTTTCATCTC TGGCTCAGTG GTTAATGAAC CTGATGAGTA TCCATGAGGA CATGGGTTTG ATCCCTGGCC TCTCTCAGTG 11280
 11281 GGTAAAGTAA GGATCTGGTG TTGCCATGAG CTGTGGTGTA GGTGTCAGAT GAGGCTCAGA TCCGAGTTG CTTGCTCTG 11360

11361 GGTGTAGGCC AGCAGCTCCA ACTCCAATTC GACCCCTAGT CTGGGAACCA CCATAGGCCA TGGGTGCAGC CCTAACAAAGA 11440
 11441 CAAAAGACAG AAGAAGAAGA GAAGATGACA ACTATCTATA GCAAAACACTG TCAAAAACAA ACAATACAAA ACAAAACAAA 11520
 11521 AACCTGGGTT GGGATAATGA ATTTGGTCAT GGAAGGCGAT GTAGCACAAAT GGTAAAGAGC TTGGACCCCTG GAGCCCGACC 11600
 11601 CCTCGACATC TGACCTCAGT GCTGTGTGAC CTCGCACAGG TTACTTCACG TCTCTGTGCT TCACTCTTCT CATCTGTGAA 11680
 11681 GTGGATCCCT ATCCTCCTGC TCATTGGCTG TGTGTAAGAG TAAATGAATC GATATAGGAC AAGTATGTGA ACAGCCTGGC 11760
 11761 ACGTGCTAAG GGCTCCCTAA GCATTAGCTG GCACCATCAG CAGTATTCTT GACGGCAGAA AAATCCATCT AGAGAGAGAA 11840
 11841 GGAAGCAATT AGGCAGAGAA GAGCATGAAT AAAAAGCTGT CCTGCCCAGG AGATGGAGAG ATGGCAGGAG GGATGGCTTC 11920
 11921 AGTCCTGACA AGCTGGTCCC CAGCTCCAGG CACTGGAGAA GCCAGATTCT CATGGCCCAT GGGCTCCATG AATCAACTCT 12000
 12001 GAATTCTTAG AGTTAACTCA AAACCAGCCC AAGTGAATGT TTGTAACCTC AAGATGAAAC ATCTCACCTG AAACAACATC 12080
 12081 CACCTCTTCC CATCACCTG AGAAATAGAA GGTTTTAGGC AGAAGCAGCA TGAAGGTAAT AAGGGTGGTT GAGTGAGACT 12160
 12161 GTGTTGGTGT AAAGCAGTTA CCATTTAAGT ACCAAGTGTC AGTGCTCAGT TAGCCAATCA TTCCTTTGAC GGGAGCTCCC 12240
 12241 TGGGAAGGAG GTCTAGGCTT GGAACGCAAC ATCCAATTCA GGTTAGATTT ATGGCTCTGT GTGAAAGCTT GGAGAAGACC 12320
 12321 CGTAACTTTC CTGAAATCTG GATCACTTTA TTTTTTTTGC AAAACAGAGA CAGTACATGC CCAAGGCCA AGCCCCAGGC 12400
 12401 CTCCTCTGTC CTCACTAAGA TCGAGGAGAA TATTCAATAA ATAACAGGTC TGGCCAGAGC TTTGCCCAGT TTAAGGAAT 12480
 12481 GACAAAAGCT TGTGCTCCTG ATGCTCATTT TATCCATATG ACAACCTAG AGGTGGGTAG TAAGCAGCCC ATTTTATAGA 12560
 12561 AGAAGAAATG AGTCCCTTGG GCCTGTGAGT AGAGAAATCA CCATTTACC CTGGGATGTA TGACCCAGG ACACATACTC 12640
 12641 TCTTCTTTC TTCTCTTTT TTTTCTTTT TTTTGGCTGC ACCCAGGGCA CATGGAAGTC CCAGGCCAG GAATAAAACC 12720
 12721 CACCAGGAAC CAGCCTCTTA ACCCTGCACT GCACCCCTTG CATGGCTTAC AAGTGTGTT TGCTAAGGCA GAACCTTTGT 12800
 12801 CGCTGAGATT TGTGTCTCT GAAAAGACTG TCATCTGAAA TATCTACAAA ATGAGTAAAA TCCCTTCCCT TACCTTCTAG 12880
 12881 GGAGGTGTGA ACTGGAACCT GTCATGTATT CATTCACTGT GGAATTATCC CGGGAATGTG AATACTTCAT GACTTCAGAC 12960
 12961 ACCTGCCAAA GCTATTGTC TGTTTAGAAC CAAGTAAGGA TTCTTAAAG AGACTGATCT CCACTAATAT TTATATATCT 13040
 13041 TTATTTTCTT TTCTTTTAG GGCTGCAACT GCAATATATG AAAGTACTAA AAAGTAGAAA TAACATGCTT GACCCAGAAA 13120
 13121 AGACAATCAA AAAGGATAAA TATCACTTAC CAGCTGTGTG ACCTTCAAGA TGTCTTAACT TCCTGTGTCT TCAGCTTCTT 13200
 13201 TTTTTTCTT TTTTTTTGTC TTTTTAGGCC ACATCTGCGG CATATGGAAC TTCCCAGGCT AGGGGTCGAA TTGGAGCTGC 13280
 13281 AGATGCCGGC CTACGCCACC CACAGCCACA GCCACAGCAG TGGTGGTTCC AAGCCACATC CTTGACCTCT GCTGCACCTT 13360
 13361 GCAGCAACAC CAGATCCTTA ACCCACTGAG TGAGGCTGGG GATCGAAGCC ACATCCTCAT GGACACTGTG CACAGTTCTT 13440
 13441 AACCTGCTGA ACCGCAACAG GGACTCCTAA TATTATATT ATTTTCCCTT CTAGCACTGA GGAGTAGGCC TTAGGATAGC 13520
 13521 TGGGAAGGAT GTGGGGACTT GGGACAAGAG AAAGCCTTTT GAGCTGTGAC ATGCGTTAGG ACAAAATCCAC AGGGAGAATT 13600
 13601 ACAATGACCT CACCTGCATT TCTGATGCCT CTCTCCTTGT AACCAAAATT TATCCTTCTT ACCTGAGAAG CCATCAGGGA 13680
 13681 AGGTTCTATT TGGCAGTCAT TGTCATCTGT TGTTTTTTAT TTTATTTTAT TTTATTTTAT TTTTGCCTTT TTGCCTTTTT 13760
 13761 CTAGGGCTGC TCTTGAGGCA CACGGAGGTT CCCAGGCTAG GGTCTTAATC AGAGATGTAG ACACCGGCTT ACACAGAGAC 13840
 13841 CACAGCAATG CGGGATCCGA GCTGCATCTG CGACCTACAC CACAGCTCAT GGCAACGCTG GATCCTTAAC CCACTGAGTG 13920
 13921 AGGCCAGGGA TTGAACCTGC CACCACATGG TTCCTAGTCG GATTCGTAA CCACTGAGCC ACGACGGGAA CTCCATCTGT 14000
 14001 TGTTTTTTAT ATAGAAAGTT TGGCAAAGGG ATACACTTTA GGCACCATA CCTAACCTTG CACAGACTGT CTCATAGGAT 14080
 14081 GCACATCTCG CATGTTTGG TTTTTTAAAG ATGTGTATT CTTTTTACCA CAGACGTCCT CCCAGTTGT TACCAGTGGA 14160
 14161 AAAGGAGCGG TAAGTCTAAC GCTTAAATGA TGGCACCTTG GTCTGGTCAT TTAAGAAAGT GGGATAATGC TGGACCCATT 14240
 14241 TCGGGCATTT GTTTTGAGGA TTAAAGTTGT CACCAAGCAG TTTTATTTGC CTCACACAGT GTGACCAATT CAGGTTAAAG 14320
 14321 TGGGAAGGAG ACACGCAGCA TCACGGGTGA TTTTCAACAA GTAGAACAA AAGACCTAGA CACAAGCGTA CGACCTTCTG 14400
 14401 TGTGATCTGA GATGGTGTG AAAAGCAGAC CCGACTCATC TATGGTGATG AATGGCAGAT TAGAGGTGAC ACACAGTGAC 14480
 14481 AGGAAGGAAG CCGTGAAGGG ACTGGGGGGT GGGGTGGGGG GGCTGGTTAG GTTCTGTTC TTCACTGGA TGCAATTCATC 14560
 14561 ATGTGAAAA CATCACATAT AAAAATCATA TATGTATTTA TTTCTTGGCT TTTTGTGTT TTTAGGGCCG CACCAGCCGA 14640
 14641 TAGGGAGGTT CCCAGGCCAG GGGTCCAATT GGAGCTGTAG CCACCGGCTT ACACCACAGC CAGGCCACA TCAGATCCAA 14720
 14721 GCCACATCTG TGACCTACAC CACAGCTCAC AGCAACGCCG GATCCTTTC ACACGGAGTG AGCCAGGGA TCAAACTCGC 14800
 14801 ATCCTCACGG ATGTAGTCGG GTTCGCTAAC CACTGAGGCA CGACAGGAAC TCCCAAGCTA TATATTCTA ATTTATATAC 14880
 14881 TTTTATGCAC GTATACTATT TTTTAAATAA ATCACCCTTC TTCCCCCAA AATGAAGAAG AATTACGTAT TATATGCAGA 14960
 14961 TTCACACATT TATAGGATT CTGAACACTG TCTTTGGTTT TTCCAAGTAA CTGCAAACT TGAAAATGTA TAGGGCTACA 15040
 15041 AGCGTGGCTG TTCCCATCA GATCAAGCAA ATGGATGGG AAATTAGTGT GCTCATGCT TTGGTGTAAA TTTTAAAAAT 15120
 15121 TCATATCAAA ATGATGGGG ATACACTGAA ACTGTTTACT TTTTACAGCA GTTTGGTAAT AGATGGGAAC AGTATCTAAT 15200
 15201 TGTGCTTTG AACTGTATCA GCTTTTCCGT GTTGATGGGA CATTTGTTTT TCTATTCCCA GGAATGGCCT GTTGGTCTTT 15280
 15281 GTCCAATTTT CTCTGCGT ATGGCCTTTC CCCAGTTGAT TTAACATATG AACATTGAGT CCTATGAAA TGAGCCCTTT 15360
 15361 GTACAGTACA TTGATCATGA GTATCCCAT ACTCTTTTGA TTTAGGGCT GTGCAGGTT CTGTCTTTTA TTTATTTATT 15440
 15441 TATTGTCTT TTCTTTTTC TAGGGCCACA CTTGAGCAT ATGGAGTTTC CCAGGCTAGG GTTGGAAATCG GATGATCAGG 15520
 15521 TGCCGGCCTA AACCACAGCC ACGGCAACGC AGGATCTGAG CTGCTCTTT GACCTACACC ACAGCTCACA GCAATGCCAG 15600
 15601 ATCCTTAACC CACTGAGCAA GGCCAGGGAT CGAACCCCTG GCCTCATGTT TCCATGCTGG ATTCATTTCT GTGCGCCACG 15680
 15681 ATGGGAATC CTATTATTTA TTTTAAAGCA TTGAACCCCT CTTTCTCTG GGAGAACCTG ACTGTTCTCT CTGTGCAGGA 15760
 15761 CTGTGGGCC CTCTGCGGAT TAGCAGCAGG CATCCCATCC CTGCTGGCCA CAGCCCTGCT GTTGGCCTTA CTGTTGATT 15840
 15841 TGATTACCG CAGAAGAAGA AGCAGCGAAT CCACCGAGGT GATCAGCAGC TTCTTTGGGT CTGGACGTGT TGGCGGGGAA 15920
 15921 TCGTCTTCAA GGAAGTGGCT TTGGGCCCCG GGTGTGAGGA CCCGAGTCTG TTTTCTGAGG GCAAGAAGGC CAGCTTCTCT 16000
 16001 GGCCTGATC TGTGATTGG ATTCATGGCA TTACTTCCAA ACAGGGCTGA TTCTGCACAC AACCTTCAA GCTACTGAGG 16080
 16081 ATGGTATTTG GGGGAGGGG GACAAAAAGT AGCGGCAGAG TGGGATGTTT GTTGCCATGG TGAACACATC CGTAAAGTGA 16160
 16161 GTGTATTTTC TTTCTTTCTT TCTTTTCAGG GCCACACCCA CAGCATATGG ACTTTCCAG ACTAGGGGTC TAATCGGAGC 16240
 16241 TGTAGCTGCC AGCCTACACC CCAGTACAC GGGATCCTTA ACCCACTGAT TGAGGCCAGG GATCGAAGCT GCGTCTCTAT 16320
 16321 GGATGCTAGT CAGGTTTGT TCCGCTGAGC CACGATGGGA ACTCTGTGAG TGTGTTTTCT AACCTTGAGG AAAAGGGGG 16400
 16401 ACAAGCTGCA CAAAGAGGGT AGAAGTGATT TTAGGAAATA GAAGACGGAC ACGGAGGTGT CTGTCGTAGG GACCTGTACG 16480
 16481 CAGTCTGTGA CTCCACTTAA TTCCATCCTT ATTTATGTAC AGTCCTGGTT GTTCTCACAC TGGAAGCAT TCACGGGGAG 16560
 16561 TAGAAAACCT AAGTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT 16640
 16641 GTTCCAGGC CAGGGGTCGA ATCAGAGCTG TAGCCGCTGG CCTACACC AGCCACAGCA ATGCTGGATC CTTAACCCAC 16720
 16721 TGAGCAAGGC CAGGGATCAA ACCACGTTT CTAATGGATC TAGTCTGGTT CGTTAACTGC TGAGCCATGA CAGGAATCC 16800
 16801 TAGAAAACCT AAGTTCTAAC CTTGCTCTG CCACTTTATG ATTTATATGA TCCTGGACAA GTGATGACAT TTTCTACACC 16880
 16881 CAGGTTAGTT CAACTTAAAA ATAAGAGTCA TAAGAACTAC CCCCAGGCG TCCTGGTGG CTGAGCAGGT TAAGAACTCT 16960
 16961 TTGTTGTAC TGCAGTGGCT CCGGTCACTG CTGTGGCTCC GGTCACTGCT GTGGCTCAGG TTTGATCCCT GGCCAGGAA 17040
 17041 CTTCCATCAT TCACAGTGT CGCCGAAAA ACAAAACAAA AACCCAACC ACCTTATTTT AAGAGTAAAG CAGAGGAGTT 17120
 17121 CCCATCACGG CTCAGTGGTA ACAAATCCCA ATAGGATCCC GTGTTGCTGT GGCTATGGT TAGGTTGGCA GCTACAGCTC 17200
 17201 CGATTCCACC CAGGCTGAG AATTTCTATA TGCCTCAGT GCAGTCTTAA AAAGACAAAA ACCAAACAAA CCAAAACAAA 17280
 17281 AAACAACAAA AGGTAAGCAG AGTTGTAAG ATCGAATGAG ATCTGGGTA CAAAGTGTGC TGACAAGCTG TAAACTTTAA 17360
 17361 ACATGTTAAG AAGTATTATG GTGTGCGTA TTTGTTATTT AAGCAATAGA ACCTCAACAT TCAGGGCACT TTAACCAACC 17440
 17441 CTTGAGGTT ACAGAAGTAC CAACCACCAA AACCAATTAA ATTCTGGGTG AAGGAGCTGT GGCATTAGTA CTAAGAGGA 17520
 17521 AAGCCCAACA GCAAAAAATC CACCATTCAA CATTTACTAC AGATAATTT AACCAGATGC TAAAGTAGAA CGCATAGTAT 17600

17601	GATGAATCTA	GTTATCAAAC	CCAATCTTGT	TTCGTCTCCA	CTCCCCACTT	CTCCACACTC	TCAACCTGTA	CTATTTTGTGA	17680
17681	AATAACTCAC	AGTTGTATCT	CTTGTTTATG	GGTTTTTCTG	GGGGGTGGGG	TGGGGCAGTT	ATTATCTGTT	TATTTGGTTT	17760
17761	TGTTTTGAAA	GCTCTCTTGG	GAGTTTAAATG	GTTTTTAAATCA	TGATCATGGG	CAAAATGATGT	AACCTTTCAT	TTCTCCTTCT	17840
17841	TTTTAATTTT	ATTTTTTAAA	CCAATTTAGG	AAATCGAGAG	GCCTTGTGAA	ATTTTCAGAAA	TCTATGACAA	TCCCAGGGTA	17920
17921	GCTGAGGTAA	GAAGTCTTGG	TATAGAATCA	CTATACATCA	TTCAGTCAGT	GAACAAACCA	GGGTCTTAAA	GCCTCTCATG	18000
18001	GACAGAAAGT	ACAGTGCCTG	CACTGGTGGT	GAAACTCAAG	CACAGAGGAG	CTTCCCATT	CATTTGTATT	GGCTGGACAG	18080
18081	GAATTCAGAA	TTTGATTTAA	TATTTAAAAA	TTAATATCTC	TTATTTTCACT	GACAAAAGAG	AAAGATCATG	TGACCATCTC	18160
18161	CACAAGAGAA	GTGAGGTCAA	AAAAAAATTA	AACAGCCCTT	TGTGATGGGG	AACCTCTAGC	AAGCTACAAA	TTTAATAGGA	18240
18241	ACTTTCTTAC	CTTGAAACTA	AACATCTTTT	TAAAAAAATT	ACAGCAAGTA	TCATACCTAA	AGATAACATG	TTAATGAATT	18320
18321	CTTTTTCATA	TCAGTAACAA	AAACAAGGGT	GTTTATTAAAT	ATCATTTTCCA	CTCAATCCGT	ACTTTAGGTC	CTAGACAATG	18400
18401	CAATAGGATA	AGAAAAAGAA	GTACATTTGA	CTTCTTGGAT	TCAGTGGAAT	CCTTTCACAA	TGTATATGTA	TATCAAATAA	18480
18481	TCACACCATA	CTCTTTAAAT	ATCTTAAACAA	TTTTGTCAAT	TATACCTCAA	TAAAGATGAA	AAAAATGAAG	TAGAGAGCAT	18560
18561	AAGACTGGAA	AAGAAGAAAC	AAAATCATCA	TTATCTACAG	ACTATATGAG	TGTCTATATA	GAAAAGCCAA	ATTATCTTACA	18640
18641	GGTAAATTAT	TAGCATTAAC	AAGAGATTTT	GACAAGTTTG	CTGGATATAA	AATCAATATT	AAAAATAATT	TACATTTCTA	18720
18721	GAATTCAGTA	AAAATGAATT	AGAGGATTTT	CCATTGTAGC	TCACCTGGAAA	TGAATCTGAC	TAGGAACCTAT	GAGGTTGCAG	18800
18801	GTTTGATCCC	TGGCCTTGCT	CAGTGGGTGA	AGGGTCCGGC	ATTGCCACGA	GCTGCAGTGT	AGGTTGCAGA	CTCGACTTGG	18880
18881	ATCCTGCACT	ACTGTGGCTG	TGGCATTCGT	AGGCTGGCAG	CTGTAGCTCT	GATTCGACCC	CTGGCATGGG	AATCTCCATA	18960
18961	TGCCACAGGT	GTGGCCTTAA	AAAGCTAAAA	AAAAAAAAGT	AGAATTAGAA	AAAGTAATTT	TTAAAAATCC	CACACGGTAG	19040
19041	CAATAAGATA	AGATAATAAC	ATGATAAGGA	ATCAATCCAA	CAAAAGCAAT	TAATCCTTTT	ACAGAGATGA	ATGAAAATCC	19120
19121	AGGTAAAGAA	TATGAAATAA	AACTTAAATA	ATGGGAGTTT	GTATACAATG	CCCCTGGATA	GGTAGACTCA	ACAGCATGCA	19200
19201	GATGTCAAAG	AACTTCAAAT	TGATCTATAT	AATAATCTAA	TTCCAGTATA	AACCCCAATA	GATTTTTTTC	ATAGACCTTA	19280
19281	TTAAGGTGCT	TCTAAAATCT	ACATAGAAGA	CAGAAAAAAA	ATTTGTAATA	CCAACAAACA	GATAGAATAG	AAAACAAATA	19360
19361	TGGGGAGTTT	CCATCATGGC	TTAGTGGTTT	CCAAATCCGA	CTAGGCAACG	TGAGGTGCGA	GTTTCAATCC	CTGGCCTTGC	19440
19441	TCAGTGGGTT	AAAGATCCTG	CCTTGCTGTG	AGCTGTGGTG	TAGGTTGCAG	ACGCGGCTCG	GATCCCAGAT	TGCTGTGGCT	19520
19521	CTGGCGTAGG	CTGGTGGTTA	CAGCTCTGAT	TAGACCCTCA	GCCTGGGAAC	CTCCAGATGC	CAAGAGAGAG	GCCCTAGAAA	19600
19601	ACGTAAAAAA	AAAAAAAATA	AAAAAAAATA	AAAGAAAGAA	AAGAAAACAA	ATAGGAAGAG	GAAGATGGTA	GATTAAAAAC	19680
19681	CAACCATATC	AATGATCACA	TTGAAGATGT	CCAATGTCTT	GAAAACTCTT	TGTTTCAAAT	GTCTTGTCTG	ATGTTTGGTT	19760
19761	GTTTCAGGCG	GGAGGGTAAA	TCTGGTTGCT	GTTACTCCAA	CTTGACCAGA	AGGAGAAGTC	TTTGTCTGCAT	TTTTTAAAAAC	19840
19841	CTATTTTGT	TTTCAAGAAT	CCTAGGAGGT	CACCACACAC	TGAGAAGAAC	ATAATGGGAG	CAGAAGAGC	CCACATATAC	19920
19921	GTGAAGACGG	TATCAGGCAG	CCAGGAGCCC	ATGCGTGACA	CGTACCCTCC	TGCCGTGGAA	ATGGAGAGAA	GGAGGGGACT	20000
20001	TGGGTGGCTT	ATTCCAGAGC	TGAGCCTGGA	GTGATGCAGC	CCAGCCAAGG	AGCAGATCCG	GGGTGGAAC	AGAGCTAAAC	20080
20081	ACACAGGCCT	TTGCACCTGG	AGTGAGGAGA	GACGCCAAGC	TGCTTCTTAA	CCAGTCCAAA	TTTCATTTGC	AGATCTGGAA	20160
20161	AAGTTTCAAG	TTGATTTTTT	TCTTTAGGGG	ACTGATCTGA	TAAAGTGCAT	TCCGACTCTC	AGATCTTGGG	GTTTAGTGCA	20240
20241	ATGAATTCAT	TGTGCTTCCA	AAGGGAGCCC	TCGGATCCTG	TCCTTGAGCC	CAGTGACAAC	TTGCTTTTCT	TGGTGACTGG	20320
20321	GCGAAAGGGG	TTTGATTTCT	CGGTGACTGG	CCTCTGATC	TTTTTTCACA	TCCATTTTCT	CAAAAGAGCC	ATCAGACCTG	20400
20401	GCTGCCATGG	GAGGGTGGCC	AAGGCTAGCA	TGGTGAAGC	TGGGCTGGGC	TATACAGGGC	ATGTGTGAGG	AGAAGAAGTT	20480
20481	CCTTATCTTT	GAACCACTCG	GGGCAGAAAT	CACAAGGAGC	CACATGTTCC	CCAATCACAG	GGGCAGCAG	TGGCTGCGCA	20560
20561	TTCACCACGC	CACTTGTGTA	TTGGGGGCAT	CCAAGGAAGG	CAGTCTGCA	GTGGGCTCTG	TGTGTGTGTG	CTGAAGATAA	20640
20641	ACAGTGTGGA	GGGAAGGCAG	AGGTTGTTTC	AAAAGGTCAT	TAGCAATGAG	GAATATACCT	GTTTTTGTGG	GAGTGGAGAG	20720
20721	AAAGGCTCAA	GTCTTGGAAC	GGTCATGGGG	AGAAACTCAC	TAGGAGGAAG	CGAGATCAAG	AGGCTCTGAG	TGGCTGAGGG	20800
20801	CCTAAGGGAT	GGGCCCTGTG	ACTGTCTTGG	TGTCACACTG	TGACTGTGAG	TAGCATTTGAA	GCATTGTGAT	TGTCATCTGA	20880
20881	GGGGAGCTGG	TGCACAGAGG	CAGCTGGTCC	AGGGATGCCT	TTGCCATCAC	TTCTGTGAGG	AGGCTAAGGG	GAGTCCCCCT	20960
20961	GTGCAGGCCC	ATCGTCCTCC	TGATGAGAGA	GCCGGGTCC	AGGGCATCGG	GGGTTTCCAC	CACCAGCTCC	CTGGGCCACC	21040
21041	TTGATAAGCT	GTGGAAACAG	TCCTCACAAA	GGGCCCTTGA	TTGCTCAGAA	ACACACCTCC	TCTTCTTCAA	ATAGCCAAGG	21120
21121	ACAGGTTCTA	CAAACCCACT	CACCTGCCAG	TACCAGCAGC	CTCCCTTCAA	AGCTCCTTGT	GACATTTCAGT	TTTGCGCTAA	21200
21201	GTCCACTAGA	TCCCGTCACC	TAACAAGCAT	ATTTTAAAGCA	GACGTGCACA	GTGACCCGGA	TACTTGTGCT	TATCTTTACAT	21280
21281	ATTGGGGAGG	ACTTTGGATT	TGCTGAGAAC	ATGACGGTGG	CCTTGGCTTT	GAGGCTCAGG	TGTGAGTTCT	GGGGCAGATC	21360
21361	AAGGGTCTGA	GCTCTGTATG	TGCAGAAATG	AGAGCGCTGT	TTTCGTCTCT	CTACCCCTTAG	GGCTGTTGTG	AGTCCCAACA	21440
21441	GAAATATGCG	CAGGTGATGA	TAAGTCTTGT	GGTCTATAGA	GTAAGGTGTG	ACTTGTATTT	TTGGACCATT	CATTTTAAAT	21520
21521	CTACTTACAG	GCCGTTGCTT	AGTATCTTTA	TTTGAAATGG	TTTCTACTAA	ACTAGCAAGA	TTCAAGTATT	CTGTCACTTT	21600
21601	TTTTTCCTGC	TCTGATGCAC	AAAAACTTAT	TTTGAATAAA	AGTGGAAGAT	AAAATGGCCA	TTCTTGTGGA	CCTACAACAT	21680
21681	GTCTGTGGTT	TTTCTTTGCC	TATATTAAAG	TAAATGACAT	TGACCCTTAA	GGCTGGAGTC	AAGATC		21746
	10	20	30	40	50	60	70	80	

7.2 Die Promotorregion pProm 4.350/UTR

```

1  CCTAAGGTAG CTGTTAAAGG TCGCTCTCCA AGGACATGAA  AACTCTGTAG TTTCAGCCTT TAGAAGTTTA AATAAGATTA 80
81  ATGGTTTCCC TGGAAACTG GAGGGGGCAG ATGTCAGAAA  CAGAGTCAGC TCTGCGTCAG GATTTGCCCC CTTGTGAAAC 160
161 AATGGTCCTT ATTTGTCTCT CTTTAGTATG GCTATTTTTA  AAAATGCACA ACTTCAACAA TTATCAGCCT ATGACCAATT 240
241 GGAAACAATG GACGCTTGTG AAAACCTTTA TTCAGGCCTT  CTGTGCGTGA TGTATTCCCA GAAGGACAGG CTCGATTCCG 320
321 CTGGGGCTGG CCACGTGCCG CCTGAAGCTT CACAGAACTG  GTACAACGCA GGTTCGTGTA GGAGCTGCAT GGCCAGCTTC 400
401 CCAAGGGCAA GTCCCTCAGC AGAAAGAGCC AGGCCCCAGC  CTTGGCACTT CCAAATGCTC AGTGACCTTC CTGCACACCT 480
481 GCCAGGGGAC ATTACCCCTG CCTGCTTTGT CTTTAACTG  GAGATCGGGC CCTGGGGCTG TCCAGCACTC TAAGACTGGC 560
561 TTCAGACCAG AGAATTATCT TGACCTGATG GAAAATTCGG  GGGCTAGGTC TTTGGTCCGG TCCAGTTCTC GTGTAATCGG 640
641 GTCTAGCTGA TGTTAGAACC TGGACCTGGA TCCAGGGCCC  GGTGGGTGTC TGGAGTTAAC TTCAGCCTGT GGAATGTCTC 720
721 CATACAGAAA ACGAGGCTGT GCGTTGATTT GCTCGAAGAC  TCTTCCCTC CAAAGTTAAG TTTCAGATGA TTCATGAAAC 800
801 GTTCGGCCTG GCGAAATCAT TTGTAAAATC TCGTTCACCTG  GTGAATCACA CTGGGGTTTG CCATTGATCT GGTCCGCTTG 880
881 GTATGTCGCA GAGAATTTCA TAGTATTGTT ATTTTCAAG  GTCTGAATGA ATGTTCCCTT GGCTTCAGCT GATGTTTTTC 960
961 AAGTTTCCTT TGTAACCGA CCTTCTGAAA AAGAATCCCA  AATGCCTGAA AGTTTCTTTT AAAAAAGAAA AAAGAAAAAC 1040
1041 TGTTTAGACC GTTATCTATA AATATACCGT ATTTTAAAT  TTGTGTAATT GTACATTTCA TGAAAGGCTG TCAGCTTCAA 1120
1121 AGAGGAAGCG AAGAGGAGCT AACACATGTC TAGAAAGAAT  TGTCTCATT AAGAATGTGG ATCTATTGAT GAGTCCTGGG 1200
1201 TCTGTCTCT TGGTGATCAT TTTCTCCAAT TCAGCACAAG  ATCTGGGGA GCAGGGGAAA AGGGTGCCTT TTCTAGGGCC 1280
1281 TTCTGTCTCT TGGTGAGTAC CTGGCTCCAG ACAGAGCTCC  CTCCAACCCA GAAAGTCATG AGCAGATCTA AAGAGGGCTT 1360
1361 CAGAGTTGCC CCCTTCTTG GACCCAAACA GGTGAAAAT  CTGAGAACAT AATTGTGGAG CTGCTGGAGC CGAGCTCAGC 1440
1441 GTGATAAACA CACCCCAACC CCGCGTGCCC CCCTCTGCCT  CTCAGCAGCT CTCCCCATCA GGTTTTGAGA TGGAGTCTGA 1520
1521 GGACCACATG TGCCATCCAA AACTGAAGGT CCCGGCTCCT  CAAAGGGGCT CCCTGTGTTC TGGGAACCA TCCTTGCACT 1600
1601 CTCCCTCCA AGCCTAGGGG GCTGTGATGC TCTGCCATC  TTAGTGCGTG GTCCCTGGG GGAAATTTTT TTTTTTCTT 1680
1681 TTTGCTATTT CTGCGGGTC CCGCGGCATA TGGAGGTTCC  CAGGCTAGGG GTCGAATAGG AGCTGTAGCT GCCGCCTAC 1760
1761 ACCACAGCCA CAGCAACGTG GGATCCGAGC CCCGTCTGCA  ACCTACACCA CAGCTCACGG CAACGCCAGA TCGTTAACCC 1840
1841 ACTGAGCAAG GGCAGGGACC GAACCCGCAA CCTCGTGGTT  CCTAGTCGGA TTCATTAACC ACTGCCCCAC GACGGGAACT 1920
1921 CCCCTGGGG GAAATTTTTA TACATAGTCC TTTTCGTAAG  CCCTCCTTAA CTATAACTAA TTGAATACAT CCCTCATTTT 2000
2001 CTGTGCGGCC CCTGGCTGAT ACAGGTTTAT TTCTAACACA  AGGACAGAGA ACGCCCGCTA ATCAAAGACT GTCTTATGAG 2080
2081 TTTGACCAGA TAGAGATTTT AGGATGTGTT TGGAGTTTGT  TGTGTCATAT CAGGGAAGGG TGTGGGACCA TGTTTTTTGT 2160
2161 TTTGTTTTGT TTTGTTTTTT TGCCTTGCCC AAGGCATGTG  GAAATTCCTT GCCCAGGGAT CGAACTTGCA CCACCACAGT 2240
2241 ACCTGGAGCC ACAACAGTGA CAATGCGGGA TCCTTAAGCT  GCTGAGCCAC AAGGGAATC CTGGGACGAC GTTTTTAAAA 2320
2321 AACTCAGCT GTAACGCAAA ATGATTTAAC ACATGCAGCT  ATTTTGTGTT ATATGTACAG GGTCAAGGTT TCATGACGTT 2400
2401 TTTGCCCTTT CCTGTCACCT GTACCTAAAG GATGAGCTCC  AGTGGTGCAA GGGTGTGGAT GCTTGATGTG TCAGTTTGTC 2480
2481 AAGATGGGGT CGCTTATGCC AAAACAACAA AAAAACCCT  CTGACGTGTC AGGGTTCTTA CAGGAGAAAG ACCTATTCTT 2560
2561 TGTCACACT ACATGTTTCGT CTCTTTTATC TGGAAGCCCC  TCCATCCAC TCTCAGTCAG GAGTGGCCTG ATGGCGCAGC 2640
2641 ▶ pProm 1.700 GGCTGTGGG AACTTGCTGA TTTCTGTGGC AGAGGGAAAC  AGTGTGACAA ATCACATGCC AGCTCTTAGA ACCACCAGC 2720
2721 AGTGACACAT CACTTCCACT CACATGTCAC TGGCCAGAGC  AACTCACGGA GCTGCCCTA ACTTCACAGT AAGGACGAAA 2800
2801 TGACCTAAAG ATGCTCTGGT GGTCCCACCA ATGACTCTCA  CATGTGACAT TCATAGATGG GGAAGTGACC AGAACCTTC 2880
2881 TGTCTGTTTT CACTGTGTC TTCATCACTG CTTCCTTACT  GATTTTTTAC TTTTCTTTG TAGGTATCAC CTGCAGCATA 2960
2961 ▶ pProm 1.350 TGGAAGTCGA ATAGGGGTCG AATCGGAGCT ACAGCTGCCG  GCTGTTGCCA TAACTACAGC AACGCAGGAT CCGCGCTGTA 3040

```

3041 TCTGCCACCT ACACCACAGT TTATGGCAGC GCCGGATCTT TGACCCACTT AGTGAGGCCA GGGATCAAAC CCGCATCTCT 3120
 3121 GACCCTATTT CAGGTCCTTA ACCTACTAAA CCACAACGGG AACTCTTCAT ATGCATCTTA AATGCCATCT CCCAGACAGT 3200
 3201 CTGAAGCAGC TGCCTCCTGG TCACTCCAGT CCCTCTTCCC TTCCTCCCCA CTTGCTCTTC TACAGTCATT TTCCCTTGTT 3280
 3281 CTTTTTTTAA AATTTTTTTT TATTTTTTTG TCTTTTCTAG GGCCACTCCC GCAGCATATG GAGGTTCCCA GGCTAGGGGT 3360
 3361 CCAATCGGAG CTGTAGCCGA TGGCCTACGC CAGAGCCACA GCAACTCGGG AATTGAGCCG CGTCTGCGAC CTACACCACA 3440
 3441 GCTCATGGCA ACGCCAGATC CTTAACCAC TGAGCGAGGC CCGGGATTGA ACCCGAAACC TCATGGTTCC TAGTCAGATT 3520
 3521 GGTTAACCAC TGCACCACGA TGGGGACTCC GATTTTCACT TGTTCTGATG GCTGTGGTC TGCATCCCT GAATACCTTC 3600
 3601 CCTAAGAGTT GGGGCCTCAT TTGTCTTCAT CACCAAGCCC AGGACAGTGC CCAGGATAAT GCTTGGCCTG TAGACCAAGG 3680
 3681 GTTAAAAAGG GTTGTGTAGT AAATGAACAA ATACACTCAA TGAAACCACC AAATTATTGG TTTAATCTTG TTGTTTGTGTT 3760
 3761 AACGTGAGAC TGCAATTCCT CCCTTGTTTT ATTTTATTT GTTTAATTAT TTACTTTATA GGGCTGCACC TGCAGCATAT 3840
 3841 GGAGGTTCCC AGGCTAGGGG TCCATTGGA ACTGTAGCCA CCGGCCTACG CCACAGCCAC AGCCACACGG GATCCTTAAC 3920
 3921 CCACTGAGCA AGGCCAGGAA TTGAACCTGC AACCTCATGG TTCCTAGTCG GATTCGTTTC TGCTGTGTCA CGATGGGAAC 4000
 4001 TCCTCCTCCC TTGTTTTAAA GATGCAACTC CCGGAGTTCC CACTGTGACT CAGTGGTTAA CAGAACCCGA CTAGGAACCA 4080
 4081 TGAGGTTGTC AGTTCGATCC CTGGCCTCGC TTTCTGTGG CTGTGGTGTA GGCCAGGGGC TACAGTCCA ATTGGACCCC 4160
 4161 TAGCCTGGGA ACCTCCATAC GCTGCAGGTG CGGCCCTAGA AAATGCAAAA AGTGAATAAA TAAGGAAGCA ACTTCCTAAA 4240
 4241 AGAGAGCTCT TAAGAAGTAT AAGGCCCCC TTGTCAATGC TTCCTCCACC AAAAATGTGC AAACAGAAGG AGGGTGAGGC 4320
 4321 ⁺¹ TGCATTCAAG GCGGTGCACT CTCCGTGGCA GCTATAGCCG TGCCTCCAAC ACAGAGCAGG CTGCACCCCC CACCTCCAAG 4400
 4401 GCTTCCTACA TCGACACAGG TAATGTGTTG ACTCCATCAC TCGGGGATGG TGGGCAGTGC CACTGCCTGG CAGCTGGGGA 4480
 4481 TGGAGTGGCC AACTAAGCCT CACTTCGCCT GTGTAACCCA TTGTCTCTAA AGAGCAGCTG GCTGCAGAAG CCACCAAGGT 4560
 4561 CTCGGGCCAG CTGTGGGCTC TTTGCTGAGA TGAAGGGGTA ACCATGGAAG AGGCTTGAAA AGTCAATAAG GACCAAAAAT 4640
 4641 GACTGCGAAG TGGTTAGATG ACCCGGGGCC TTCCATGGTG GCCATGACAC AGGAGACCTT CTTCCCCGGG GGCTGGGCCA 4720
 4721 AAGACTCAGC TACTCCCCTG ACCATAAATG GCTTGGCCAG CATTCTCTTG GAGCCACCTC TTGCTCTGTC ACCCTTGCTC 4800
 4801 TCCCAGCTGG ATGGTCCTAC AAATGCAAGA CACACGCCAA CAACACCAGC AAGAAAGGAA CTTGCCAAGG GCAGTGTGTTG 4880
 4881 GAGAAGGCTC CTGGGAGGCT GTCGGAAATG GTGAGTGAGA GCTTGCATCT TTCTCTGCC TAACCTTCAT TTCTCACCAT 4960
 4961 AAAAAACAAT CCCAGGCTT TAAAGCTCA CTCTCCATT CAAATATAAA TGTACCCTTG ATGCAAGGAA GTTAAGGAGC 5040
 5041 TTGGTTTTTT AAATTATTTT CCCATATGCA AAATACTAAT TCTCATCTAA TATTTGCTGA CCCCATCTCA TATTTTAATA 5120
 5121 TTAAGCTTTT GTTTTGTAGC CCCACGTAC AAAGGTGAAA AGTGAATATT TCAGCTAAAT TCCTTTCCCA GTCAAAGCAA 5200
 5201 TGGGTCAGAT CAATGCCTTT CTTCTTATTT GTTCAGTGTG CTTTGGCTA CATGATCAGC CACAGAGATA TTGAGAAGTT 5280
 5281 GCATCAGAAA CTACTCACCT TTCTAACTGA CTAGT 5315

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sabine Perl
Geburtsdatum: 3. Mai 1969
Geburtsort: Langen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1976-1979	Carl-Orff-Grundschule in Rodgau
1979-1981	Förderstufe der Georg-Büchner-Schule in Rodgau
1981-1985	Gymnasium der Georg-Büchner-Schule in Rodgau
1985-1988	Gymnasiale Oberstufe der Claus-von-Stauffenberg-Schule in Rodgau
Juni 1988	Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

Studium:

04/1990-06/1996	Studium der Chemie an der Technischen Universität Darmstadt
03/1993	Abschluss des Diplom-Vorexamens
11/1995	Diplom-Hauptexamen
12/1995-06/1996	Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. H. G. Gassen: „Das hirnspezifisch exprimierte Gen 83.5: Vervollständigung der genomischen Sequenz und Ermittlung des Transkriptionsstartpunktes“, ausgeführt am Institut für Biochemie der Technischen Universität Darmstadt
09/1996	Beginn der Promotion am Institut für Biochemie der Technischen Universität Darmstadt unter Leitung von Prof. Dr. H. G. Gassen
08/1996-01/1999	Promotionsstipendium nach dem Hessischen Gesetz zur Förderung von Nachwuchswissenschaftlern der Technischen Universität Darmstadt

Berufstätigkeit:

02/1999-06/2000	Wissenschaftliche Mitarbeiterin innerhalb der Biotech-Unit der Hessischen Technologiestiftung GmbH, Wiesbaden
seit 07/2000	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt

Sabine Perl

Darmstadt, den 25. März 2002
Kaisersteinweg 6
64404 Bickenbach

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Sabine Perl

Darmstadt, den 25. März 2002
Kaisersteinweg 6
64404 Bickenbach

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.